

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Secuenciación masica de exomas y uso de TAG-SNPS en genes candidatos
para identificar variantes genéticas asociadas a reacciones adversas severas
a capecitabina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Pellicer Corbí

Directores

Luis Andrés López Fernández
Irene Iglesias Peinado

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**SECUENCIACIÓN MASIVA DE EXOMAS Y USO DE
TAG-SNPS EN GENES CANDIDATOS PARA
IDENTIFICAR VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A
REACCIONES ADVERSAS SEVERAS A CAPECITABINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Pellicer Corbí

Directores:

Dr. Luis Andrés López Fernández

Dra. Irene Iglesias Peinado

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



**SECUENCIACIÓN MASIVA DE EXOMAS Y USO DE
TAG-SNPS EN GENES CANDIDATOS PARA
IDENTIFICAR VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A
REACCIONES ADVERSAS SEVERAS A CAPECITABINA**

TESIS DOCTORAL

MARTA PELLICER CORBÍ

Madrid, 2017

SECUENCIACIÓN MASIVA DE EXOMAS Y USO DE TAG-SNPS EN GENES CANDIDATOS PARA IDENTIFICAR VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A REACCIONES ADVERSAS SEVERAS A CAPECITABINA

Memoria que presenta Marta Pellicer Corbí

Para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Dr. Luis Andrés López Fernández

Dra. Irene Iglesias Peinado

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



Dr. Luis Andrés López Fernández, Jefe del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Dra. Irene Iglesias Peinado, Decana y Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado **SECUENCIACIÓN MASIVA DE EXOMAS Y USO DE TAG-SNPS EN GENES CANDIDATOS PARA IDENTIFICAR VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A REACCIONES ADVERSAS SEVERAS A CAPECITABINA**, ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia **Dña. Marta Pellicer Corbí** bajo nuestra dirección, para la obtención del Grado de Doctor, y considerando que se ha concluido y reúne los requisitos oportunos, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos el presente en Madrid a 16 de octubre de 2017.

Dr. Luis Andrés López Fernández

Dra. Irene Iglesias Peinado

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han acompañado en estos tres años con las que he compartido multitud de momentos y de las que he aprendido y no dejaré de aprender nunca.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Luis Andrés López Fernández e Irene Iglesias Peinado. Siempre estaré agradecida a Luis ya que, desde que le conozco, ha sido un ejemplo de profesionalidad, paciencia y rigor. Sin él este proyecto nunca se hubiera materializado puesto que fue quien me concedió esta oportunidad y ha sido mi referente y principal foco de aprendizaje en este ámbito, ayudándome a crecer como profesional. También se lo agradezco a Irene por aceptar dirigirme y guiarme en este camino facilitándome todo el proceso de consecución de la tesis doctoral. Igualmente debo agradecer y destacar la ayuda y el apoyo recibido por parte de María Isabel García.

Al Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón por acogerme y brindarme esta posibilidad y todos los recursos a su alcance así como al BioBanco del hospital por la cesión de las muestras. También agradecer que este proyecto haya sido parcialmente apoyado por el Ministerio de Economía (PI12/00056) y financiado por fondos FEDER "Una forma de hacer Europa". Y, por supuesto, agradecer a todos los pacientes que participaron en el estudio.

A mi madre, por estar siempre conmigo ayudándome a seguir adelante, apoyándome en los momentos más difíciles, preocupándose por mí y no permitiendo que tirara la toalla en ningún momento.

A mi hermana, Patricia, mi mejor amiga, mi consejera, mi compañera de viaje. Siempre me ha dado su opinión, tan importante para mí. Sin ella, este camino hubiera sido imposible.

A mi padre, por hacer que me embarcara en este proyecto profesional, por no dejar que me rindiera y continuara hasta alcanzar mi meta.

A mi familia por interesarse en todo momento por mí y estar a mi lado.

A Javi, por confiar en mí. Nunca estaré lo suficientemente agradecida por toda su ayuda, su paciencia, su cariño, su comprensión. Me considero muy afortunada por tenerle a mi lado.

A mis amigas, María, Ana, Cris, Belén y Rocío, por tantos momentos buenos que hicieron olvidar los menos buenos, por comprender en ocasiones mi “aislamiento”, por sacarme de casa, por estar siempre ahí haciéndome ver el lado positivo de las cosas.

A María por servirme de guía, por sus consejos, sin ella todo hubiera sido más complicado.

Siempre he sabido que estaba rodeada de gente maravillosa, a todos y cada uno de ellos,
GRACIAS.

A TI

Por llenar de luz mi suerte

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XVII
ABSTRACT.....	XXIII
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Cáncer colorrectal. Aspectos generales	1
1.1.1.- Epidemiología	1
1.1.2.- Factores de riesgo, sintomatología, diagnóstico y clasificación.....	3
1.2.- Tratamiento del cáncer colorrectal	6
1.2.1.- Cirugía.....	6
1.2.2.- Radioterapia	7
1.2.3.- Quimioterapia.....	7
1.3.- Fluoropirimidinas.....	9
1.3.1.- Mecanismo de acción	11
1.3.2.- Toxicidad.....	14
1.4.- Variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos	18
1.5.- Farmacogenética	21
1.5.1.- Principios básicos.....	22
1.5.2.- Estrategias para la búsqueda de biomarcadores farmacogenómicos	23
1.5.2.1.- Estudios de asociación de genes candidatos.....	24
1.5.2.2.- Estudios de genoma completo	26

1.6.- Farmacogenética de las reacciones adversas a fluoropirimidinas en cáncer colorrectal	27
1.6.1.- Dihidropirimidina deshidrogenasa.....	28
1.6.2.- Timidilato sintasa	30
1.6.3.- Metilentetrahidrofolato reductasa	31
1.6.4.- Citidina deaminasa.....	33
1.6.5.- Otros genes implicados en la ruta de las fluoropirimidinas	33
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
2.1.- Hipótesis.....	39
2.2.- Objetivos	39
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1.- Diseño del estudio.....	43
3.2.- Población de estudio.....	43
3.2.1.- Criterios de inclusión.....	43
3.2.2.- Criterios de exclusión	44
3.2.3.- Aspectos éticos	44
3.3.- Variables del estudio.....	45
3.3.1.- Datos de pacientes.....	45
3.3.2.- Datos del tratamiento.....	46
3.3.3.- Reacciones adversas y su gradación	46
3.4.- Aislamiento de ADN	48
3.5.- Selección de tag-SNPs	48
3.6.- Genotipado de tag-SNPs	49
3.7.- Secuenciación de exomas	50
3.8.- Identificación de variantes en los exomas secuenciados	53
3.8.1.- Verificación de las variantes obtenidas en regiones codificantes	53

3.8.1.1.- Secuenciación de Sanger	55
3.8.1.2.- SNaPshot.....	56
3.8.1.3.- LightSNiPs	58
3.8.1.4.- PCR a tiempo real con sondas TaqMan™	59
3.8.2.- Predicción del efecto de las variantes <i>in silico</i>	61
3.9.- Genotipado de polimorfismos en la población global de estudio	61
3.10.- Análisis estadístico.....	62
4.- RESULTADOS.....	67
4.1.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en genes candidatos mediante selección de tag-SNPs.....	67
4.1.1.- Características basales de los pacientes.....	67
4.1.1.1.- Análisis de datos de pacientes y de tratamiento recibido	67
4.1.1.2.- Análisis de reacciones adversas severas	70
4.1.2.- Tag-SNPs seleccionados en la ruta de las fluoropirimidinas y genotipado .	70
4.1.3.- Análisis de la asociación de tag-SNPs y reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina	72
4.2.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en genes candidatos mediante secuenciación de exomas.....	83
4.2.1.- Características basales de los pacientes.....	83
4.2.1.1.- Población global	83
4.2.1.1.1.- Análisis de datos de pacientes y de tratamiento recibido	83
4.2.1.1.2.- Análisis de reacciones adversas severas	85
4.2.1.2.- Población seleccionada para el análisis de exomas	85
4.2.2.- Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas	88

4.2.3.- Variantes genéticas identificadas en la ruta de fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas.....	91
4.2.3.1.- Análisis individualizado de las variantes identificadas por paciente	96
4.2.3.2.- Análisis de las variantes genéticas no sinónimas y <i>frameshift</i> en regiones codificantes	98
4.2.3.3.- Análisis de la predicción del efecto de las variantes <i>in silico</i>	100
4.2.4.- Validación de la asociación de polimorfismos genéticos a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en la población global	102
4.2.4.1.- Análisis del efecto acumulativo de las variantes en <i>DPYD</i> sobre las reacciones adversas severas	105
5.- DISCUSIÓN.....	109
5.1.- Dihidropirimidina deshidrogenasa.....	118
5.2.- Timidilato sintasa	121
5.3.- Metilentetrahidrofolato reductasa	123
5.4.- Citidina deaminasa.....	124
5.5.- Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	126
5.6.- Uridina monofosfato sintetasa	127
6.- CONCLUSIONES	135
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	139
8.- ANEXOS	165

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad por tipo de tumor (10 tumores más frecuentes) en España para el año 2014.	2
Figura 2. Incidencia de los tumores más frecuentes en España en el año 2015 (ambos sexos).	3
Figura 3. Representación de los diferentes estadios del CCR.	6
Figura 4. Ruta farmacocinética de fluoropirimidinas.	10
Figura 5. Ruta farmacodinámica de fluoropirimidinas.	13
Figura 6. Variación individual en la respuesta a un fármaco.	19
Figura 7. Influencia de la variabilidad genética en la respuesta y la disposición de fármacos.	20
Figura 8. Localización de los SNPs en genes y clasificación de aquéllos localizados en regiones codificantes.	23
Figura 9. Ciclo del folato.	32
Figura 10. Preparación de las librerías mediante amplificación, digestión parcial de los fragmentos amplificados y ligamiento de adaptadores.	52
Figura 11. Procedimiento de genotipado mediante sondas TaqMan™. <i>Life Technologies Corporation</i>	60
Figura 12. Proporción de tag-SNPs seleccionados en cada gen analizado.	71
Figura 13.- Control de calidad de la secuenciación masiva. Datos relativos a la densidad de <i>Ion Sphere™ Particles</i> (ISPs), lecturas útiles para el alineamiento y tamaño medio de lectura ofrecidos por el software Torrent Suite 4.2.1 (<i>Life Technologies</i>).	90
Figura 14. Número y porcentaje de variaciones encontradas por gen de la ruta de las fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas.	91
Figura 15. Número y porcentaje de variaciones encontradas por tipo de variación mediante secuenciación de exomas.	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y estadios TNM. Adaptado del AJCC.....	5
Tabla 2. Reacciones adversas más frecuentes asociadas a 5-FU y capecitabina.....	18
Tabla 3. Reacciones adversas registradas y su gradación.....	47
Tabla 4. Tag-SNPs seleccionados en <i>CDA</i> , <i>CES1</i> , <i>DPYD</i> , <i>ENOSF1</i> , <i>SLC22A7</i> , <i>TYMP</i> , <i>TYMS</i> y <i>UMPS</i>	49
Tabla 5. Condiciones de la amplificación exónica.....	50
Tabla 6. Condiciones de la PCR utilizada para la amplificación exónica.....	51
Tabla 7. Condiciones de la PCR utilizada para la digestión parcial.....	51
Tabla 8. Condiciones de la PCR utilizada para ligar los adaptadores a los fragmentos.....	51
Tabla 9. Condiciones de la PCR utilizada para la ecualización de las librerías.....	52
Tabla 10. Técnicas y secuencias de oligonucleótidos empleadas para la verificación de las variantes obtenidas en regiones codificantes.....	54
Tabla 11. Condiciones de la PCR utilizada en la secuenciación de Sanger.....	56
Tabla 12. Condiciones de purificación por <i>ExoSapIt</i>	56
Tabla 13. Condiciones de la PCR inicial de la técnica SNaPshot.....	57
Tabla 14. Condiciones de la reacción de SNaPshot.....	58
Tabla 15. Condiciones de la reacción de LightSNiPs.....	59
Tabla 16. Polimorfismos genotipados en la población global y técnicas de genotipado empleadas.....	62
Tabla 17. Características basales y de tratamiento.....	69
Tabla 18. Reacciones adversas severas.....	70
Tabla 19. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. Se resaltan en rojo aquéllos valores de p estadísticamente significativos ($p<0,05$).....	73
Tabla 20. Tablas de contingencia de las asociaciones estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. Análisis univariante según modelo codominante.....	75

Tabla 21. Regresión logística multivariante según modelos dominante y recesivo de las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.....	80
Tabla 22. Características basales y de tratamiento de la población global.....	84
Tabla 23. Reacciones adversas severas en la población global.....	85
Tabla 24. Características basales y de tratamiento de la población destinada al análisis de exomas.....	87
Tabla 25. Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas I.....	88
Tabla 26. Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas II.....	89
Tabla 27. Variantes genéticas identificadas pertenecientes a la ruta de fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas.....	93
Tabla 28. Variantes genéticas no sinónimas pertenecientes a la ruta de fluoropirimidinas identificadas en regiones codificantes.	99
Tabla 29. Predicción del efecto de las variantes genéticas <i>in silico</i>	101
Tabla 30. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas en la población global. Se resaltan en rojo aquéllos valores de p estadísticamente significativos ($p < 0,05$).	103
Tabla 31. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en la población global. Análisis univariante según modelo codominante.	104
Tabla 32. Regresión logística multivariante según modelos dominante y recesivo de las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en la población global.	105
Tabla 33. Frecuencias de reacciones adversas en pacientes tratados con capecitabina en función de la puntuación obtenida en base a la presencia de variantes de riesgo en <i>DPYD</i> (rs1801158, rs1801159, rs1801160, rs1801265 y rs2297595).	106

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.....	165
--	-----

Anexo 2. Artículo original: <i>Identification of new SNPs associated with severe toxicity to capecitabine</i> . Pellicer M, García-González X, García MI, Robles L, Grávalos C, García-Alfonso P, Pachón V, Longo F, Martínez V, Blanco C, Iglesias I, Sanjurjo M, López-Fernández LA. <i>Pharmacological Research</i> . 2017. 120: 133–137.....	175
--	-----

Anexo 3. Artículo original: <i>Use of exome sequencing to determine the full profile of genetic variants in the fluoropyrimidine pathway in colorectal cancer patients affected by severe toxicity</i> . Pellicer M, García-González X, García MI, Blanco C, García-Alfonso P, Robles L, Grávalos C, Rueda D, Martínez J, Pachón V, Longo F, Martínez V, Iglesias I, Salvador S, Sanjurjo M, López-Fernández LA. <i>Pharmacogenomics</i> . 2017. 18 (13) 1215-23.....	180
---	-----

Anexo 4. Producción científica: artículos publicados y comunicaciones a congresos...	189
--	-----

ABREVIATURAS

ABC: *ATP-binding cassette*

ADN: ácido desoxirribonucleico

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

ARN: ácido ribonucleico

CCR: cáncer colorrectal

CDA: citidina deaminasa

CEA: antígeno carcinoembrionario

CeGen-PRB2-ISCI: Centro Nacional de Genotipado- Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos – Instituto de Salud Carlos III

CES: carboxilesterasa

CNV: variación del número de copias

CTCAE: *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

CYP2A6: citocromo P450 2A6

dbSNP ID: número de identificación de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information SNP database*

DHFR: dihidrofolato reductasa

DHFU: dihidrofluorouracilo

DPYD: dihidropirimidina deshidrogenasa

DPYS: dihidropirimidinasa

dTMP: deoxitimidina-5' monofosfato o ácido timidílico

dUMP: deoxiuridina-5' monofosfato o ácido desoxiuridílico

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

ENOSF1: enolasa superfamilia M1

ERCC2: *excision repair cross-complementation group 2*

FBAL: fluoro-beta-alanina

FdUDP: fluorodeoxiuridina difosfato

FdUMP: fluorodeoxiuridina monofosfato

FdUTP: fluorodeoxiuridina trifosfato

FL: fluoresceína

FOLFIRI: 5-fluorouracilo + leucovorín + irinotecan
FOLFOX: 5-fluorouracilo + leucovorín + oxaliplatino
FPGS: folilpoliglutamato sintasa
FRET: *Fluoresce Resonance Energy Transfer*
5-FU: 5-fluorouracilo
FUDP: fluorouridina difosfato
FUDR: fluorodeoxiuridina
FUMP: fluorouridina monofosfato
FUPA: fluoro-beta-ureidopropionato
FUTP: fluorouridina trifosfato
GCSF: factores estimulantes de colonias granulocíticas
GGH: gamma-glutamyl hidrolasa
GWAS: *genome wide association study*
IC: intervalo de confianza
INDEL: inserción/delección
ISPs: *Ion Sphere™ Particles*
LC: *LC-Red DY*
LD: *linkage disequilibrium*, desequilibrio de ligamiento
LV: leucovorín
MAF: frecuencia del alelo minoritario
MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa
NCI: *National Cancer Institute*
NGS: *next generation sequencing*
OR: *odds ratio*
pb: pares de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PharmGKB: *The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base*
PolyPhen: *Polymorphism Phenotyping*
PPAT: fosforribosil pirofosfato amidotransferasa
RRM: ribonucleótido reductasa
rs: *reference SNP*
SAM: S-adenosilmetionina

SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant*

SLC: *solute carrier*

SMUG1: *single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1*

SNP: *single nucleotide polymorphism* o Polimorfismo de Nucleótido Único

SYSNPs: *Select Your SNPs*

TAS-102: trifluridina/tipiracilo hidrocloreto

TDG: timina-ADN glicosilasa

THF: tetrahidrofolato

TK1: timidina quinasa 1

TP53: *tumor protein p53*

TSER: región promotora de *TYMS*

TYMP: timidina fosforilasa

TYMS: timidilato sintasa

UCK: uridina-citidina quinasa

UMPS: uridina monofosfato sintetasa

UPB1: beta-ureidopropionasa

UPP: uridina fosforilasa

UTR: *untranslated region*

vs.: *versus*

WT: *wild type*

XELIRI: capecitabina + irinotecan

XELOX: capecitabina + oxaliplatino

XRCC3: *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*

***“Si no fuera por la gran variabilidad entre individuos,
La medicina sería sólo ciencia y no arte”***
(“The Principles and Practice of Medicine”, Sir William Osler, 1892)

RESUMEN

RESUMEN

Introducción.- Poder predecir el riesgo individual de toxicidad severa inducida por la quimioterapia basada en fluoropirimidinas sería un extraordinario avance en la personalización del tratamiento del cáncer colorrectal. Las fluoropirimidinas, principalmente 5-fluorouracilo y capecitabina, siguen constituyendo el pilar fundamental del tratamiento del cáncer colorrectal. Se ha demostrado que la genética del paciente es un factor fundamental en la forma en que dicho paciente responde a un fármaco. Hasta el momento, se han identificado algunos polimorfismos en genes implicados en la farmacocinética y farmacodinamia de las fluoropirimidinas. De hecho, ciertas guías de práctica clínica recomiendan el genotipado de algunas variantes en *DPYD*, el mayor metabolizador de 5-fluorouracilo, con el fin de estimar el riesgo de toxicidad. Sin embargo, el valor predictivo de estas pruebas genéticas sigue siendo claramente insuficiente, lo que dificulta su implantación real en la práctica clínica. Es, por tanto, necesario identificar nuevas variantes genéticas asociadas a toxicidad severa a fluoropirimidinas mediante nuevas aproximaciones para mejorar los test farmacogenéticos actuales. La selección de tag-SNPs y la secuenciación masiva de exomas podrían revelar nuevas variantes genéticas asociadas a toxicidad y/o validar las ya existentes, además de ofrecer una visión general del perfil farmacogenético.

Objetivos.- Identificar nuevas variantes genéticas asociadas a toxicidad inducida por capecitabina y/o validar las ya existentes mediante la selección de un grupo de tag-SNPs y secuenciación de exomas de pacientes con toxicidad severa a este fármaco y posterior análisis en genes asociados con la farmacocinética y farmacodinamia de las fluoropirimidinas.

Material y métodos.- Estudio observacional, ambispectivo y multicéntrico en el que se incluyeron pacientes con cáncer colorrectal tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. El estudio fue aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica locales y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

Por un lado, se seleccionaron 23 tag-SNPs en los genes *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* y *UMPS* que fueron genotipados en el Centro Nacional de Genotipado- Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos – Instituto de

Salud Carlos III mediante la tecnología *OpenArray*® en una cohorte de 301 pacientes con cáncer colorrectal que habían recibido quimioterapia basada en capecitabina.

Por otro lado, se secuenciaron 8 exomas de pacientes con reacciones adversas graves (grado>2) tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina, en un secuenciador *Ion Proton*™ utilizando el kit *ION Ampliseq*™ *Exome RDY* v3. Los SNPs no sinónimos localizados en regiones codificantes y clasificados como dañinos o probablemente dañinos por herramientas de análisis de funcionalidad de proteínas como *Sorting Intolerant from Tolerant* y *Polymorphism Phenotyping* v2, fueron genotipados en una cohorte de 319 pacientes para estudiar su posible asociación con toxicidad severa.

En ambas aproximaciones se establecieron dos grupos de pacientes en base a la clasificación *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v4.0 dependiendo del grado de toxicidad desarrollada (nula/moderada, de 0 a 2, *versus* severa, mayor o igual a 3). El estudio de las asociaciones entre variantes genéticas y toxicidad se realizó mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal (SPSS v15.0) y el análisis multivariante de las asociaciones previamente significativas incluyendo como variables de confusión sexo, tipo de cáncer, hospital, estado funcional y fármacos concomitantes. Por último y para evaluar la posibilidad de que la toxicidad observada fuera fruto del sumatorio de pequeños efectos de variantes en *DPYD* se llevó a cabo un estudio con los polimorfismos en este gen encontrados en regiones codificantes mediante secuenciación masiva de exomas. Para ello, se analizaron las reacciones adversas severas en la población de 319 pacientes y se generó una puntuación según el número de variantes de riesgo.

Resultados.- El análisis de los tag-SNPs reveló que 10 de ellos estaban asociados con reacciones adversas severas a regímenes quimioterápicos basados en capecitabina ($p<0,05$): rs12726436, rs2072671 y rs1048977 en *CDA*; rs12119882 en *DPYD*; rs2270860 y rs4149178 en *SLC22A7*; rs2853741 en *TYMS*; rs699517 común a *TYMS* y *ENOSF1* y rs2279199 y rs4678145 en *UMPS*. A excepción de rs2072671, la asociación entre dichos polimorfismos genéticos y riesgo de toxicidad inducida por capecitabina no había sido descrita previamente.

Por otra parte, se identificaron 17 variantes genéticas no sinónimas en los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado. Cinco de estas variantes, localizadas en regiones codificantes de los genes *ABCC4*, *DPYD* y *MTHFR* y clasificadas como dañinas o probablemente dañinas por las herramientas de análisis de funcionalidad de las proteínas, fueron genotipadas en la población de 319 pacientes. El análisis reveló dos asociaciones estadísticamente significativas entre SNPs y toxicidad severa, *DPYD* rs1801160 con riesgo de toxicidad global ($p=0,029$) y *MTHFR* rs1801133 con retraso en la administración de capecitabina por toxicidad ($p=0,047$).

El análisis del efecto acumulativo de las cinco variantes en *DPYD* reveló una correlación positiva entre la prescripción de factores estimulantes de colonias granulocíticas, toxicidad hepática y global, síndrome mano-pie, astenia y retraso, reducción de dosis o retirada de capecitabina por toxicidad en pacientes y el número de variantes en *DPYD*, aunque éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Conclusiones.- El uso de tag-SNPs es una estrategia útil para encontrar nuevos polimorfismos asociados con toxicidad severa a capecitabina en genes candidatos. Por su parte, la secuenciación de exomas permitió validar variantes genéticas previamente descritas asociadas a toxicidad, por lo que es una técnica válida para identificar nuevos biomarcadores. El estudio de variantes en *DPYD* sugiere que podría haber un efecto acumulativo de variantes con pequeños efectos individuales. Estos polimorfismos, identificados o validados por estos nuevos abordajes, son potenciales marcadores farmacogenéticos que pueden ayudar a mejorar los test predictivos de reacciones adversas severas a capecitabina, facilitando la personalización del tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction.- To be able to predict the individual risk of severe toxicity induced by fluoropyrimidine-based chemotherapy would be an extraordinary step forward in personalizing colorectal cancer treatment. Fluoropyrimidines, primarily 5-fluorouracil and capecitabine, remain the cornerstone of colorectal cancer treatment. It has been demonstrated that the genetics of the patient is a fundamental factor on the type of response to the treatment. So far, some polymorphisms have been identified in genes involved in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoropyrimidines. In fact, certain clinical practice guidelines recommend prior genotyping of some variants in *DPYD*, the major metabolizer of 5-fluorouracil, in order to estimate the risk of its toxicity. However, the predictive value of these genetic tests remain clearly insufficient, making it difficult to fully implement it in clinical practice. It is therefore necessary to identify new genetic variants associated with severe toxicity to fluoropyrimidines by developing new approaches to improve current pharmacogenetic tests. The selection of tag-SNPs and the massive exome sequencing could reveal new genetic variants associated with toxicity and / or validate the existing ones, besides offering an overview of the pharmacogenetic profile.

Objectives.- To identify new genetic variants associated with capecitabine-induced toxicity and / or validate the existing ones by selecting a group of tag-SNPs and exome sequencing of patients with severe toxicity to this drug and subsequent analysis in genes associated with pharmacokinetics and pharmacodynamics of the fluoropyrimidines.

Materials and methods.- Observational, ambispective and multicenter study in which colorectal cancer patients treated with capecitabine-based chemotherapy regimens were included. The study was approved by the local Clinical Research Ethics Committees and all patients signed the informed consent.

On the one hand, 23 tag-SNPs were selected in the *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* and *UMPS* genes that were genotyped at the Centro Nacional de Genotipado- Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos – Instituto de Salud Carlos III using OpenArray® technology in a cohort of 301 patients with colorectal cancer whom had received capecitabine-based chemotherapy.

On the other hand, 8 exomes of patients with serious adverse reactions (grade > 2) treated with capecitabine-based chemotherapy regimens were sequenced on an *Ion Proton*[™] sequencer using the ION Ampliseq[™] Exome RDY v3 kit. Non-synonymous SNPs located in coding regions and classified as damaging or probably damaging by protein functional analysis tools such as Sorting Intolerant from Tolerant and Polymorphism Phenotyping v2 were genotyped in a cohort of 319 patients to study their possible association with severe toxicity.

In both approaches, two groups of patients were established based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 depending on the degree of toxicity developed (null / moderate, from 0 to 2, versus severe, greater than or equal to 3). The study of associations between genetic variants and toxicity was performed using the linear by linear association χ^2 Pearson test of (SPSS v15.0) and multivariate analysis of previously significant associations including as confounding variables sex, type of cancer, hospital, performance status and concomitant drugs. Finally, and in order to evaluate the possibility that the observed toxicity was the result of the sum of small effects of *DPYD* variants, a study was carried out with the polymorphisms in this gene found in coding regions by massive exome sequencing. For this, the severe adverse reactions were analyzed in the population of 319 patients and a score was generated according to the number of risk variants.

Results.- The analysis of tag-SNPs revealed that 10 of them were associated with severe adverse reactions to capecitabine-based chemotherapy regimens ($p < 0.05$): rs12726436, rs2072671 and rs1048977 in *CDA*; rs12119882 in *DPYD*; rs2270860 and rs4149178 in *SLC22A7*; rs2853741 in *TYMS*; rs699517 common to *TYMS* and *ENOSF1* and rs2279199 and rs4678145 in *UMPS*. Except for rs2072671, the association between such genetic polymorphisms and the capecitabine-induced toxicity risk has not been previously described.

On the other hand, 17 non-synonymous genetic variants were identified in the 8 patients whose exome was sequenced. Five of these variants, located in coding regions of the *ABCC4*, *DPYD* and *MTHFR* genes and classified as damaging or probably damaging by protein functional analysis tools, were genotyped in the population of 319 patients. The analysis revealed two statistically significant associations between SNPs and severe

toxicity, *DPYD* rs1801160 with global toxicity risk ($p=0.029$) and *MTHFR* rs1801133 with delayed administration of capecitabine due to toxicity ($p=0.047$).

The analysis of the cumulative effect of the five *DPYD* variants revealed a positive correlation between the prescription of granulocyte colony stimulating factors, hepatic and global toxicity, hand-foot syndrome, asthenia and delay, dose reduction or withdrawal of capecitabine due to toxicity in patients and the number of *DPYD* variants, although these differences were not statistically significant.

Conclusions.- The use of tag-SNPs is a useful strategy to find new polymorphisms associated with severe toxicity to capecitabine in candidate genes. For its part, the exome sequencing allowed to validate genetic variants previously described associated to toxicity, reason why it is a valid technique to identify new biomarkers. The study of *DPYD* variants suggests that there could be a cumulative effect of variants with small individual effects. These polymorphisms, identified or validated by these new approaches, are potential pharmacogenetic markers that can help to improve the predictive tests of severe adverse reactions to capecitabine, facilitating personalized treatments in patients with colorectal cancer.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Cáncer colorrectal. Aspectos generales

El cáncer es una enfermedad causada por el crecimiento descontrolado de las células, que modifican su forma, su tamaño y otras características. Como resultado, aumenta el número total de células, éstas se extienden por órganos y tejidos adyacentes, se introducen en los ganglios linfáticos o en los vasos sanguíneos y, finalmente, colonizan otros órganos lejanos (metástasis). Por tanto, entendemos como cáncer colorrectal (CCR) el crecimiento incontrolado de las células del colon y/o el recto¹.

Actualmente se acepta que el CCR se origina a causa de una acumulación de errores genéticos, presentes como defectos hereditarios, o bien, de forma secundaria, resultado de determinados factores ambientales¹. La edad media de presentación es 70-71 años y la mayoría de los pacientes tienen más de 50 años en el momento del diagnóstico, pero también puede aparecer en personas más jóvenes².

Los tumores malignos colorrectales pueden originarse en cada una de las 3 capas: mucosa, muscular y serosa, siendo el adenocarcinoma, originado en las glándulas de la mucosa, el tipo histológico más frecuente (90-95%)³.

1.1.1.- Epidemiología

El CCR representa un problema mayor de salud pública. Su pronóstico depende considerablemente del estatus al diagnóstico habiendo mayores probabilidades de curación si el diagnóstico es temprano. Sin embargo, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer más frecuente en Europa con más de 200.000 muertes por año. En España, se registraron 15.449 casos en el año 2014 siendo el tumor más frecuentemente asociado a mortalidad por detrás del cáncer de pulmón (tanto en varones como en mujeres) (Figura 1)⁴.

Figura 1. Mortalidad por tipo de tumor (10 tumores más frecuentes) en España para el año 2014.



Instituto de Salud Carlos III. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. 2014.

Según el informe REDECAN 2014, la supervivencia del CCR, aunque de forma ligera, ha mejorado en los últimos años en España. Asimismo, según el Instituto Nacional de Epidemiología, entre los años 2003-2012 la mortalidad por tumores se redujo un 1,32% al año, pese a que se experimentó un aumento global de la incidencia. Estas tendencias, reflejan las mejoras en la supervivencia de los pacientes debido a las actividades preventivas, a las campañas de diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos⁵.

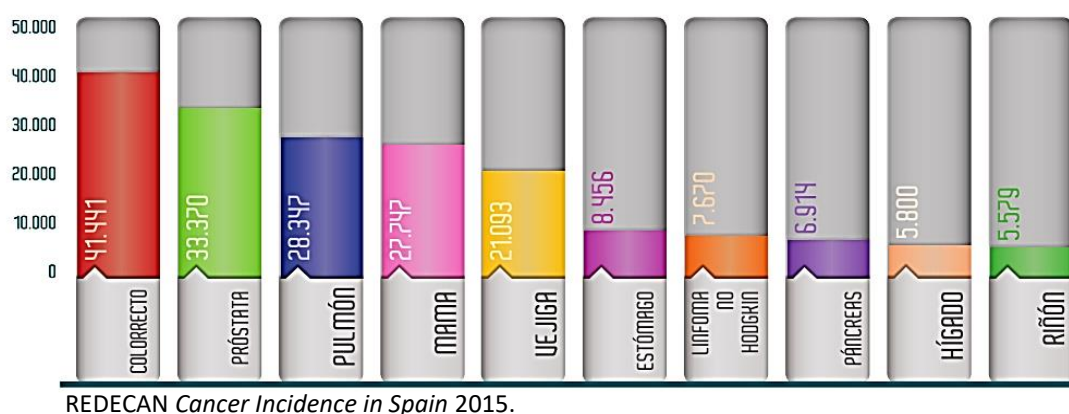
En cuanto a su prevalencia mundial, el CCR ocupó el tercer lugar en el año 2012 por detrás de los tumores de próstata y mama. En España su prevalencia a 1, 3 y 5 años fue de 2.394, 60.853 y 89.705 casos, respectivamente⁶.

Según el informe anual editado por la Sociedad Española de Oncología Médica correspondiente al año 2017, el CCR constituye uno de los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados en España en el año 2015 con 41.441 casos, junto con los cánceres de próstata (33.370 casos), pulmón (28.347 casos), mama (27.747 casos) y vejiga (21.093 casos) (Figura 2), siendo el segundo tumor más frecuentemente diagnosticado en varones (después de próstata) y en mujeres (después de mama). Asimismo constituye uno de los tumores más frecuentes a nivel mundial junto con los de pulmón, mama, próstata, estómago e hígado⁷.

La evolución temporal de este cáncer en España ha mostrado un aumento constante, sobre todo en los hombres⁸. De esta manera, la tasa estimada de incidencia ajustada a la población estándar europea pasó de 31,3 por 100.000 en el quinquenio 1993-1997 a

42,1 por 100.000 en el quinquenio 2003-2007 en hombres y de 22,6 por 100.000 a 25,1 por 100.000 en mujeres. Este aumento de la incidencia se atribuye fundamentalmente a la influencia de los factores de riesgo⁹. Se estima que la incidencia en España del CCR en el año de 2035 sea de 49.020 casos para ambos sexos según las predicciones GLOBOCAN 2012 lo que supone un incremento continuo de esta cifra⁵.

Figura 2. Incidencia de los tumores más frecuentes en España en el año 2015 (ambos sexos).



1.1.2.- Factores de riesgo, sintomatología, diagnóstico y clasificación

Aunque la gran mayoría de los tumores colorrectales son esporádicos (más del 90% de los casos) y las causas exactas no se conocen, se sabe que existen unos factores de riesgo que favorecen su aparición¹.

Dentro de los factores de riesgo no modificables se encuentra la edad con más del 90% de los casos diagnosticados en personas mayores de 50 años. Por otra parte, se conoce que hasta un 25% de los pacientes tienen un familiar afecto y que la incidencia es mayor en aquellas personas con uno o varios familiares diagnosticados de CCR. Se observa también un riesgo aumentado en las personas con enfermedades de base como la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) y la diabetes^{10,11}. Asimismo existe un riesgo mayor en las personas con enfermedades hereditarias como la poliposis colónica familiar o el síndrome de Lynch¹².

Respecto a los factores de riesgo modificables, uno de los más importantes es el consumo de carne roja y procesada, o de carne muy hecha o cocinada en contacto

directo con el fuego. Por contra, los consumos de fibra, fruta y vegetales, así como el de lácteos o micronutrientes como folatos, calcio y vitamina D, son protectores para este cáncer¹³. Se estima que un 70% de los CCR son evitables sólo con medidas dietéticas y nutricionales¹⁴. La obesidad es otro factor de riesgo en ambos sexos, sobre todo la obesidad abdominal¹⁵. En los últimos años también se ha evidenciado el papel del alcohol y del tabaco como factores de riesgo^{16,17}. Por último, algunos fármacos han demostrado evitar la aparición de lesiones premalignas y su evolución como los antiinflamatorios no esteroideos, las estatinas o la suplementación hormonal en mujeres posmenopáusicas¹⁸.

En cuanto a los síntomas, éstos pueden ser vagos e inespecíficos y pueden ser producidos por el tumor primario (cambios en el hábito intestinal, sangrado o dolor abdominal o pélvico) o por las metástasis (ictericia, ascitis, disnea o dolor óseo)¹⁹. Entre otros hallazgos, el hemograma aportará información sobre si existe anemia y la bioquímica sanguínea puede orientar sobre la función de órganos como el hígado o el riñón. Los niveles de marcadores tumorales como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CA 19.9 son también análisis orientativos en el diagnóstico del CCR.

El diagnóstico de CCR se realiza fundamentalmente mediante colonoscopia o sigmoidoscopia, técnicas de imagen y por el análisis del tejido afectado (diagnóstico histológico y molecular)²⁰. Las principales técnicas de imagen incluyen radiografía de tórax y abdomen, ecografía abdominal o abdominopélvica, resonancia abdominal y tomografía axial computarizada para evaluar la posible enfermedad metastásica. Otras exploraciones incluyen ecografía endoscópica, tomografía de emisión de positrones, gammagrafía ósea y laparoscopia²¹.

El estudio de extensión va a permitir clasificar los tumores en estadios lo que tiene una gran importancia por sus implicaciones pronósticas y terapéuticas. La clasificación mediante los sistemas de estadificación permite estratificar a los pacientes de una forma homogénea. Esto facilita la elección del tratamiento, la comparación de factores pronósticos y de resultados terapéuticos entre grupos, así como la evaluación estadística de datos clínicos. Existen numerosos sistemas de estadificación pero el más extendido es el desarrollado por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), la

clasificación TNM (tumor-ganglio-metástasis). En función del T, N y M se definen los estadios (Tabla 1 y Figura 3)^{22,23}.

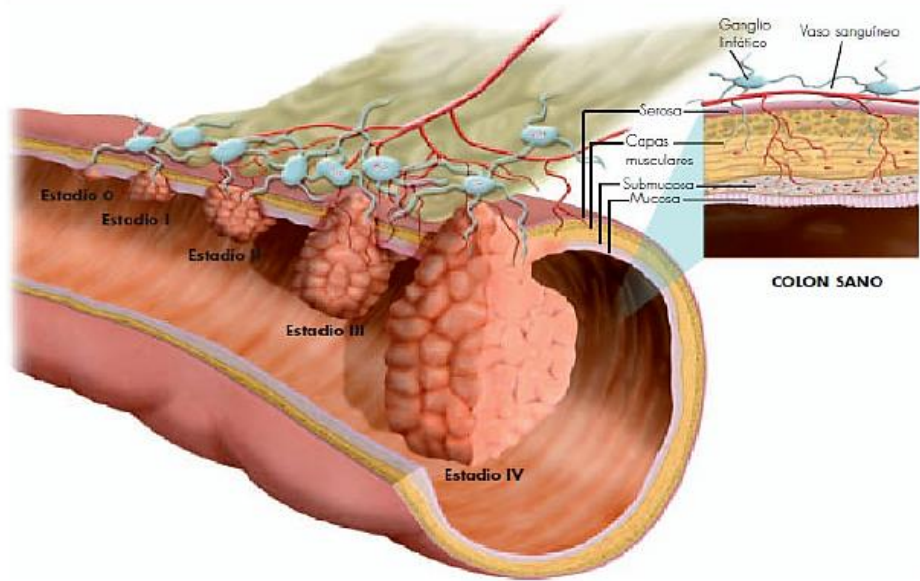
La supervivencia de los pacientes con CCR se relaciona con estos estadios, siendo >95% en el estadio 0 y va descendiendo a medida que se aumenta en la clasificación, aunque cada vez más pacientes con estadio IV se pueden curar con abordajes multidisciplinarios, conjugando participación de diferentes especialistas y tratamientos.

Tabla 1. Clasificación y estadios TNM. Adaptado del AJCC.

Clasificación TNM			
T			
Tis cáncer <i>in situ</i>			
T1 invade submucosa			
T2 invade muscular propia			
T3 invade la subserosa o grasa perirrectal			
T4 invade serosa o estructuras vecinas			
N			
N0 no adenopatías afectas			
N1 1-3 ganglios linfáticos regionales afectados			
N2 4 o más ganglios linfáticos regionales afectados			
M			
M0 ausencia de metástasis			
M1 metástasis a distancia			
Estadios			
0	Tis	N0	M0
I	T1 o T2	N0	M0
II	T3 o T4	N0	M0
III	T cualquiera	N1 o N2	M0
IV	T cualquiera	N cualquiera	M1

TNM, tumor-ganglio-metástasis; AJCC, *American Joint Committee on Cancer*.

Figura 3. Representación de los diferentes estadios del CCR.



1.2.- Tratamiento del cáncer colorrectal

Aunque el objetivo del tratamiento es siempre lograr la curación de la enfermedad, en estadios avanzados y metastásicos, en ocasiones, la finalidad es crónica o paliativa en función de la afectación.

En el tratamiento del CCR cabe distinguir entre el tratamiento locorregional (cirugía y radioterapia) y el tratamiento farmacológico sistémico. Las líneas de tratamiento pueden emplearse de forma neoadyuvante (preoperatoria), adyuvante (postoperatoria) y en ausencia de enfermedad, fundamentalmente para evitar recaídas) o ser dirigidas frente a la enfermedad metastásica.

1.2.1.- Cirugía

La cirugía se realiza principalmente sobre el tumor primario, aunque cada vez más de forma habitual se resecan las metástasis. La resección del tumor primario incluye la extirpación completa de la zona del colon donde se asienta el tumor y los ganglios perirregionales. La técnica depende de la localización del tumor²⁴.

Para los CCR resecables no metastásicos, el procedimiento quirúrgico de elección es la colectomía (extirpación parcial o total del colon) con linfadenectomía (eliminación en bloque de los ganglios linfáticos regionales que suele realizarse en la cirugía con intención curativa o radical así como cuando los márgenes no son claros o la histopatología no es favorable)^{25,26}.

Cuando existe enfermedad metastásica, se debe recurrir a la resección de las metástasis, fundamentalmente hepáticas y pulmonares, siempre que sea posible. Más infrecuentemente, se extirpan metástasis cerebrales o de otras localizaciones²⁷.

1.2.2.- Radioterapia

La radioterapia está indicada como tratamiento complementario a la cirugía para eliminar o reducir el tamaño de los tumores o para aliviar los síntomas que produce la enfermedad. A través de imágenes digitales se buscará siempre dirigir la radiación al foco tumoral procurando la mínima toxicidad a los tejidos sanos²⁸.

En los estadios II y III del CCR, se administra de forma perioperatoria para reducir el riesgo de recaídas. Además, en muchos pacientes se administra quimioterapia concomitante para aumentar la eficacia del tratamiento, como es el caso de la combinación con 5-Fluorouracilo (5-FU) para pacientes con tumores grado IV o con enfermedad recurrente²⁹. También podría considerarse en estos pacientes la radioterapia intraoperatoria³⁰.

Como tratamiento paliativo, la radioterapia es eficaz para controlar el dolor y aliviar otros síntomas. En esta situación, se suele administrar sola sin quimioterapia.

1.2.3.- Quimioterapia

En líneas generales, el mecanismo de acción de los antineoplásicos se basa en detener la proliferación y el crecimiento de las células tumorales actuando fundamentalmente sobre la división celular, los ácidos nucleicos o la síntesis proteica, pudiendo un mismo fármaco ejercer esta acción a distintos niveles.

La quimioterapia puede estar indicada como tratamiento complementario a la cirugía para prevenir la recaída por el crecimiento de células micrometastásicas residuales, en enfermedad metastásica para intentar reducir el tamaño y número de las metástasis y valorar una resección quirúrgica de las mismas o para controlar el crecimiento del tumor y aliviar los síntomas y el dolor que produce la enfermedad³¹. En el cáncer de colon no metastásico, la quimioterapia está indicada en pacientes en estadio III, no está indicada en el estadio I y en el estadio II sólo en algunos casos¹. En el caso de cáncer metastásico está siempre indicada.

Aunque las fluoropirimidinas continúan siendo el pilar del tratamiento del CCR, éste ha evolucionado considerablemente en los últimos 15 años, incluyendo protocolos de quimioterapia combinada y, más recientemente, nuevos agentes biológicos. Los principales fármacos aprobados en España aparte de las fluoropirimidinas (5-FU, capecitabina y tegafur) son el oxaliplatino, el irinotecan, el raltitrexed, el cetuximab, el panitumumab, el bevacizumab, el aflibercept, el regorafenib, el ramucirumab y la trifluridina/tipiracilo hidrocloreto (TAS-102)^{32,33}. Estos fármacos en general se pueden combinar entre sí, formando esquemas de quimioterapia cuya eficacia y tolerancia varían según sus componentes. Estas combinaciones de fármacos han mejorado el pronóstico de la enfermedad pero también han aumentado la toxicidad asociada al tratamiento^{34,35}.

En líneas generales, se suele administrar después de la cirugía o de forma neoadyuvante una fluoropirimidina acompañada o no de oxaliplatino. Como tratamiento dirigido contra la enfermedad metastásica, se recomienda la administración de una fluoropirimidina junto con oxaliplatino o irinotecan y un fármaco biológico. En caso de metástasis hepáticas exclusivas irresecables, se suele administrar quimioterapia preoperatoria junto con fármacos biológicos para intentar una resección quirúrgica de las mismas.

Otros fármacos orales más novedosos, como regorafenib o TAS-102, cuya administración está basada en monoterapia, quedan reservados para pacientes con CCR metastásico que hayan sido previamente tratados o no se les considere candidatos al tratamiento con las terapias disponibles^{36,37}. Cabe destacar que TAS-102 incorpora tipiracilo hidrocloreto, inhibidor de la timidina fosforilasa (TYMP), lo que confirma la

aparición de fármacos potencialmente sustitutos de las fluoropirimidinas, de los cuales se desconoce si acabarán reemplazándolas.

Aún a pesar de los recientes avances, las fluoropirimidinas siguen constituyendo actualmente el eje central de la quimioterapia utilizada en el tratamiento del CCR y han sido, desde su aparición, los fármacos más utilizados en esta patología. Por esta razón, serán el tema central de esta memoria.

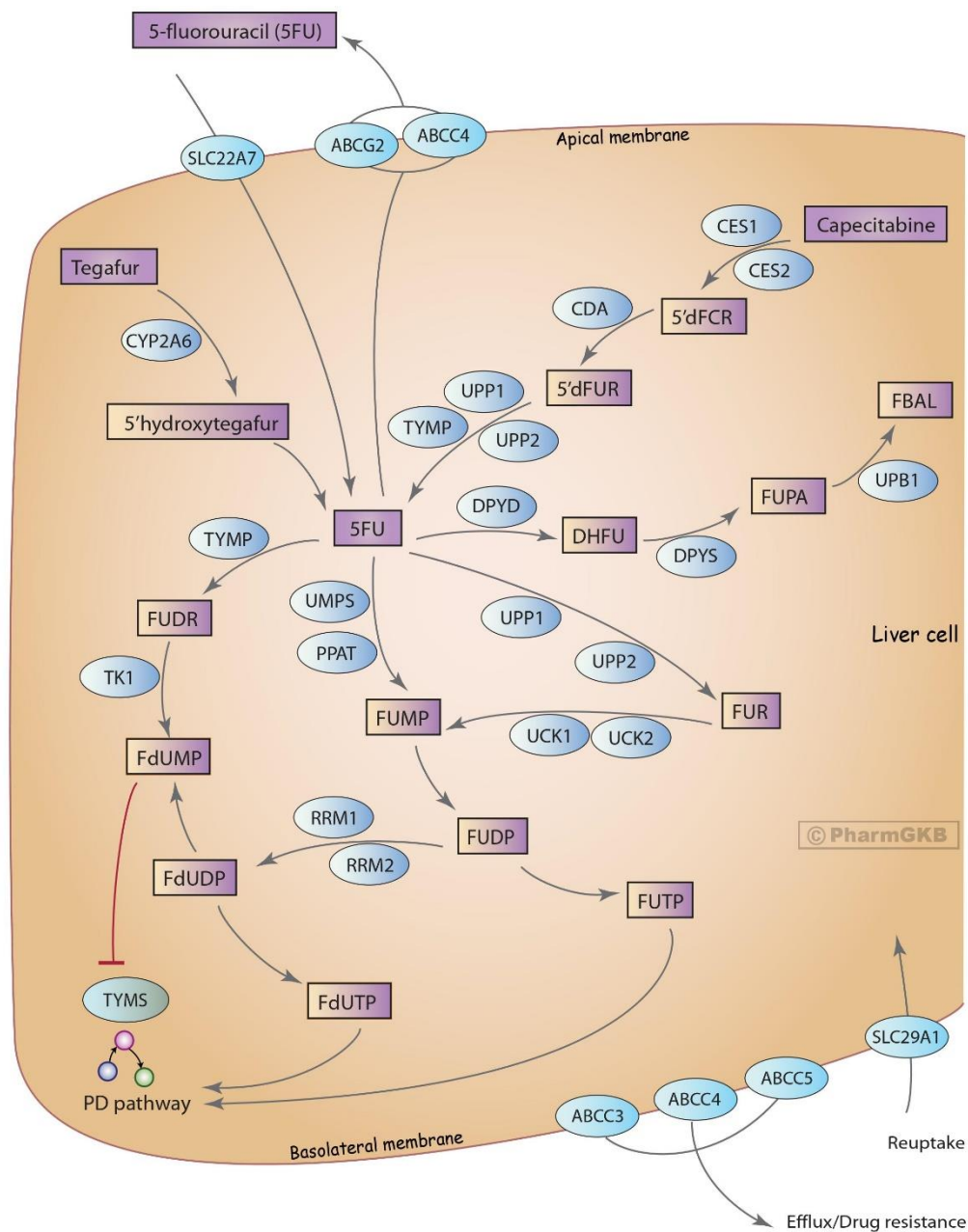
1.3.- Fluoropirimidinas

El 5-FU es el compuesto activo y existen dos profármacos que tras conversión enzimática van a conducir al mismo, capecitabina y tegafur. 5-FU y capecitabina a menudo se combinan con otros fármacos como oxaliplatino (FOLFOX y XELOX, respectivamente) e irinotecan (FOLFIRI y XELIRI, respectivamente) debido a la acción citotóxica sinérgica observada.

El 5-FU está indicado sólo o en combinación como tratamiento paliativo de neoplasias malignas comunes, en particular del CCR. La capecitabina, profármaco más utilizado del 5-FU, está indicada para el tratamiento adyuvante tras cirugía en pacientes con cáncer de colon estadio III y para el tratamiento del CCR metastásico^{38,39}. Por su parte, el tegafur habitualmente se utiliza en terapia neoadyuvante para sensibilizar el tumor antes de su extirpación.

Las formas de administración más comunes del 5-FU son la perfusión intravenosa y el bolo³⁸. La capecitabina, por su parte, se administra por vía oral³⁹, activándose a través de varios pasos enzimáticos (Figura 4^{40,41}).

Figura 4. Ruta farmacocinética de fluoropirimidinas.



Tras la adsorción a través de la mucosa intestinal, la capecitabina es metabolizada por la carboxilesterasa hepática (CES) y la citidina deaminasa (CDA). Después, la activación catalítica tiene lugar mediante la TYMP, enzima responsable de la conversión final a 5-FU⁴². Las enzimas que intervienen en la biotransformación secuencial de capecitabina a 5-FU se localizan en los tejidos tumorales, lo que permite alcanzar concentraciones más altas, pero también se encuentran en los tejidos sanos, aunque normalmente en niveles

más bajos. En el caso de tumores colorrectales, la generación de 5-FU está localizada en mayor medida en las células del estroma tumoral^{43,44}.

La conversión de 5-FU a fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) puede ocurrir a través de TYMP y posterior acción de la timidina quinasa 1 (TK1) o indirectamente a través del paso de fluorouridina monofosfato (FUMP) a fluorouridina difosfato (FUDP) y posterior acción de las ribonucleótido reductasas (RRM)^{45,46}. Entre las enzimas que participan en esta activación indirecta del 5-FU destacan uridina fosforilasa 1 y 2 (UPP1 y UPP2, respectivamente), sobre las cuales se ha investigado el uso de inhibidores para aumentar las concentraciones de uridina celular, como medio para limitar los efectos tóxicos de la exposición a nucleósidos de fluoropirimidina en tejidos sanos durante el curso del tratamiento⁴⁷⁻⁴⁹. El paso posterior a estas enzimas para dar lugar a FUMP es catalizado por uridina-citidina quinasa 1 y 2 (UCK1 y UCK2, respectivamente)⁵⁰, aunque también se puede alcanzar este compuesto de forma directa desde el 5-FU por la acción de uridina monofosfato sintetasa (UMPS) y fosforribosil pirofosfato amidotransferasa (PPAT)⁵¹.

Posteriormente el 5-FU se cataboliza por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) a dihidrofluorouracilo (DHFU) el cual es mucho menos tóxico. La DPYD es la enzima limitante de la degradación del 5-FU y se encarga de metabolizar un 80-85% del mismo, por lo que su deficiencia en los pacientes puede conducir a un aumento de la toxicidad a capecitabina y 5-FU⁵². Posteriormente, la dihidropirimidinasa (DPYS) rompe el anillo de pirimidina y finalmente, la ureidopropionasa beta (UPB1) da lugar a fluoro-beta-alanina (FBAL) la cual es eliminada por la orina.

1.3.1.- Mecanismo de acción

El 5-FU y su profármaco, capecitabina, pertenecen al grupo farmacológico de los antimetabolitos. El 5-FU es un análogo del uracilo, un componente del ácido ribonucleico (ARN). Modulado con ácido folínico o leucovorín (LV), interfiere con la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) al bloquear la conversión del ácido desoxiuridílico (dUMP) a ácido timidílico (dTMP) por la enzima celular timidilato sintasa (TYMS). En esta reacción, un grupo metilo del cofactor 5,10-metilentetrahidrofolato

(5,10-CH₂=THF) se transfiere a la posición 5 del anillo de la pirimidina, para dar lugar a dTMP, nucleótido necesario para la síntesis de ADN. La FdUMP compite con el dUMP y, en presencia de los niveles adecuados de poliglutamatos de cadena larga de THF, atrapa a la enzima TYMS en un complejo ternario, potenciado por LV (Figura 5)⁵³. El bloqueo de TYMS provoca una depleción de dTMP y una acumulación de dUMP que es incorporado al ADN produciendo errores, rotura de hebras y, finalmente, muerte celular^{51,54-56}.

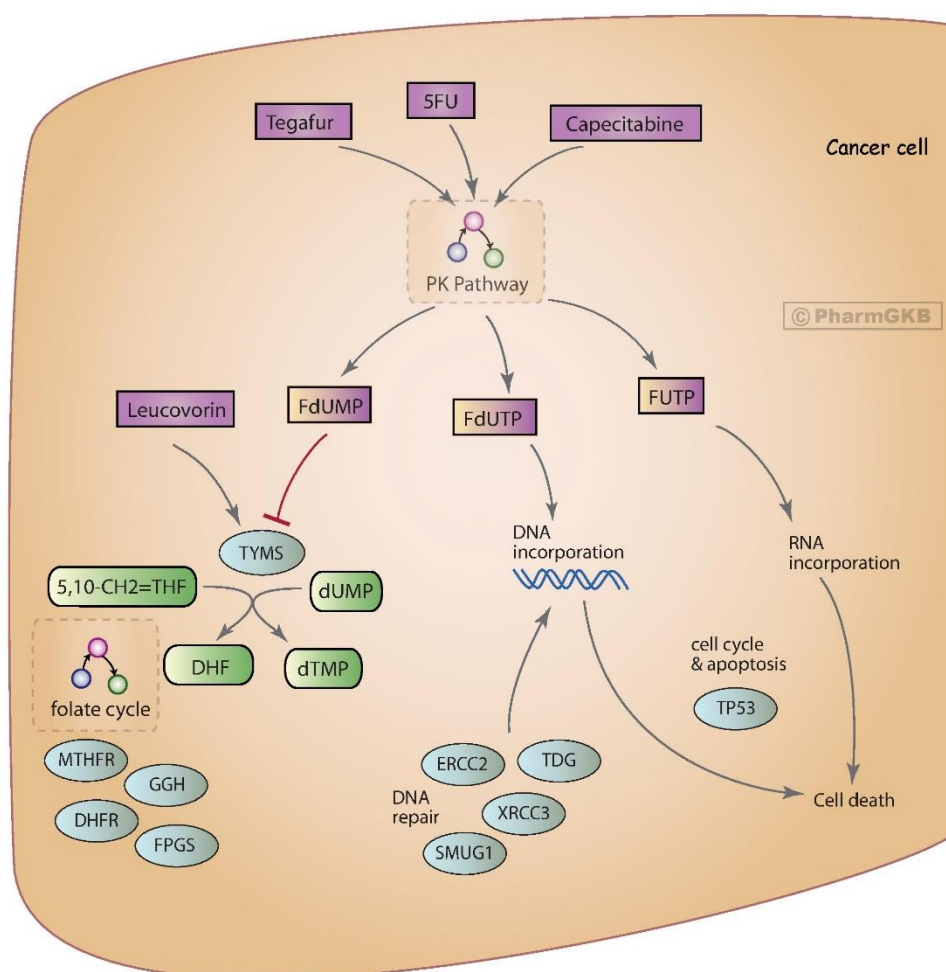
La administración de LV, folatos y la actividad de otras enzimas del ciclo de folato pueden afectar a la actividad de la TYMS. Los folatos intracelulares se convierten en poliglutamatos (forma mayoritaria) por la folilpoliglutamato sintasa (FPGS), mientras que la gamma-glutamyl hidrolasa (GGH) elimina los glutamatos terminales. Por lo tanto, FPGS y GGH se cree que juegan un papel importante en la retención intracelular y en los niveles de folato potenciando la citotoxicidad del 5-FU a través de LV^{46,57,58}. Por su parte, la expresión de la dihidrofolato reductasa (DHFR) ha mostrado encontrarse alterada en células tumorales respecto a las células normales y, aunque no constituye una diana directa de las fluoropirimidinas, podría también afectar la ruta de las mismas a través de cambios en la disponibilidad del folato⁴⁵.

De forma paralela, los compuestos intermedios de la activación del 5-FU, FUDP y fluorodeoxiuridina difosfato (FdUDP), también pueden convertirse en fluorouridina trifosfato y fluorodeoxiuridina trifosfato (FUTP y FdUTP, respectivamente). Administrado en forma de infusión continua, el 5-FU actúa fundamentalmente mediante la incorporación de FdUTP al ADN afectando su estabilidad; y administrado en bolo a dosis altas, el principal mecanismo de acción es la incorporación de FUTP al ARN, interfiriendo en su función (Figura 5^{40,41}). Los efectos de la privación del ADN y del ARN se acentúan en las células que proliferan más rápidamente y que metabolizan 5-FU con mayor velocidad.

El daño resultante en el ADN causado por la incorporación de FdUTP se produce debido al incremento de los mecanismos de reparación del ADN que causa su fragmentación y, en última instancia, la muerte celular⁵⁹. La enzima SMUG1 (del inglés, *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1*) separa el 5-FU del ADN y protege contra el daño celular, por lo tanto, la citotoxicidad del 5-FU se encuentra directamente relacionada con los niveles de SMUG1⁶⁰. Por su parte, un reciente estudio *in vitro*

proporciona evidencia de que la timina-ADN glicosilasa (TDG) es la principal enzima responsable de la escisión del 5-FU relacionada con la rotura del ADN⁵⁹. ERCC2 (del inglés, *excision repair cross-complementation group 2*) y XRCC3 (del inglés, *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*) son también enzimas integrantes de la ruta implicadas en los mecanismos de reparación del ADN. ERCC2 juega un importante papel en la reparación de los aductos del ADN en células tumorales tras la administración de quimioterapia. XRCC3 contribuye al mantenimiento de la estabilidad cromosómica a través de la reparación de la ruptura/recombinación del ADN.

Figura 5. Ruta farmacodinámica de fluoropirimidinas.



En cuanto a las formas de administración de las fluoropirimidinas, la perfusión intravenosa de 5-FU respecto al bolo ha demostrado superioridad en términos de respuesta tumoral y logra un ligero aumento de la supervivencia global, produciendo una menor toxicidad hematológica⁶¹. En pacientes con CCR avanzado, el tratamiento con 5-FU/LV ha demostrado reducir el tamaño del tumor en un 50% o más en aproximadamente el 20% de los pacientes y prolonga la mediana de supervivencia de aproximadamente 6 meses a 11 meses⁶². Las combinaciones con oxaliplatino e irinotecan han mejorado la tasa de respuesta a un 53% y 49%, respectivamente, y la supervivencia global⁶³.

La capecitabina en monoterapia y combinación con oxaliplatino ha demostrado en ensayos clínicos ser al menos equivalente al tratamiento con 5-FU/LV intravenoso en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad⁶⁴⁻⁶⁶ y superioridad frente a este mismo tratamiento administrado en bolo en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global^{42,67}. Los datos procedentes de ensayos clínicos apoyan el uso de capecitabina en combinación con oxaliplatino para el tratamiento en primera línea del CCR metastásico⁶⁸. Asimismo, se apoya el uso de capecitabina con irinotecan para el tratamiento en primera línea de pacientes con CCR metastásico debido a un incremento en la mediana de supervivencia libre de progresión de 2 meses⁶⁹.

Se ha demostrado igualmente que la adición de anticuerpos monoclonales como cetuximab, panitumumab y bevacizumab a la terapia basada en fluoropirimidinas en enfermedad metastásica prolonga la supervivencia global, mejorando las tasas de respuesta en comparación con los mismos regímenes que no los incluyen⁷⁰⁻⁷².

1.3.2.- Toxicidad

Los antineoplásicos, aunque cada vez más dirigidos, tienen en general, poca especificidad por las células tumorales, lo que provoca que, con frecuencia, otros órganos y tejidos se vean afectados, especialmente aquellas células que presentan una mayor tasa de división y crecimiento⁷³. Los nuevos agentes quimioterápicos buscan una mayor especificidad por las células neoplásicas, pero, aun así, la toxicidad a largo plazo por uso prolongado de estos aún está por definir.

La toxicidad depende de la edad, el estado funcional del paciente (medido en escala ECOG, del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group*), la disfunción de órganos, la presencia de otras comorbilidades, el estado general y nutricional del paciente, el fármaco o combinaciones de fármacos administrados, las dosis y los intervalos de administración, entre otros factores. Se ha descrito que la variabilidad genética tiene también un papel importante en la toxicidad a fármacos quimioterápicos. Muchos de los genes que codifican proteínas que interactúan con fármacos pueden sufrir variaciones que afectan a su regulación o función y esto podría contribuir a las diferencias en la toxicidad⁷⁴.

Casi todos los pacientes experimentan efectos adversos leves o moderados en algún momento del tratamiento y una minoría significativa desarrolla toxicidad severa⁷⁵. La toxicidad asociada al tratamiento quimioterápico es de extrema importancia dado que puede limitar las estrategias terapéuticas, influye negativamente en la calidad de vida percibida de los pacientes y hay un riesgo vital asociado. Por otra parte, las reacciones adversas a los medicamentos suponen importantes repercusiones económicas^{76,77}.

El principal problema de la toxicidad severa a la quimioterapia es que va a limitar la posibilidad de administrar las dosis plenas que teóricamente estarían indicadas para el tratamiento del tumor. Asimismo puede dar lugar a retrasos de dosis en alguno de los ciclos o a retiradas totales del tratamiento, afectando de igual manera la efectividad de la quimioterapia³⁵.

Las reacciones adversas severas a fármacos en general son un problema de salud pública importante. Así, un estudio en Reino Unido sugiere que 1 de cada 15 ingresos hospitalarios se debe a reacciones adversas a medicamentos, y, en el mismo sentido, un análisis realizado en Estados Unidos reveló que unos 2,2 millones de pacientes hospitalizados cada año padecen reacciones adversas, aun cuando estos han sido prescritos y administrados adecuadamente⁷⁸. Si los resultados de este último estudio son extrapolados a pacientes hospitalizados en España, alrededor de 300.000 pacientes sufren efectos adversos serios y más de 12.000 de estos mueren a causa de ellos anualmente⁷⁹. Los fármacos quimioterápicos, por sus características particulares, tienden a provocar muchos y severos efectos adversos. Además, es importante señalar el enorme coste de las reacciones adversas a la quimioterapia y cómo su control puede

ayudar a contribuir a la sostenibilidad de los sistemas de salud. Así, un estudio realizado en pacientes con carcinoma de mama metastásico concluyó que el coste asociado a las reacciones adversas a la quimioterapia podría incrementar los costes mensuales hasta en un 69,5%, lo que sería atribuible a gastos de hospitalización, ambulatorios y farmacia⁸⁰. En cuanto a los costes asociados a reacciones adversas a regímenes basados en fluoropirimidinas en particular, un reciente estudio ha expuesto que el coste medio del tratamiento de la neutropenia severa de tan sólo un paciente podría alcanzar una media de 3.044€⁷⁶.

El *National Cancer Institute* (NCI) define efecto adverso como “cualquier signo (incluyendo hallazgos de laboratorio anormales), síntoma o enfermedad desfavorable y no intencionado que está temporalmente asociado con el uso de un tratamiento o procedimiento médico que puede, o no, ser considerado relacionado con este tratamiento o procedimiento médico”⁸¹. La clasificación *Common Terminology Criteria for Adverse Events* v4.0 (CTCAE) del NCI⁸¹ permite otorgar un grado que varía de 1 (leve) a 5 (muerte) en función de la severidad y de la reacción adversa analizada, como se detalla a continuación:

- Grado 1: Leve; asintomáticos o síntomas leves; sólo observaciones clínicas o de diagnóstico; intervención no indicada.
- Grado 2: Moderado; indicada intervención mínima, local o no invasiva; limitación para las actividades diarias adecuadas a la edad.
- Grado 3: Severa o clínicamente significativa, pero no inmediatamente peligrosa para la vida; indicada la hospitalización o prolongación de la hospitalización; incapacitante; limitando las actividades diarias relacionadas con el autocuidado.
- Grado 4: Consecuencias potencialmente mortales; indicada intervención urgente.
- Grado 5: Muerte relacionada con el efecto adverso.

Los principales efectos adversos relacionados con la administración de 5-FU dependen del método de administración. Cuando la administración es en bolo, los principales efectos adversos son neutropenia, estomatitis y diarrea. Cuando la administración es en

infusión continua, se encuentra menos asociado a toxicidad hematológica y gastrointestinal pero más asociado a la producción de eritrodístesia palmo-plantar (síndrome mano-pie)⁸². Aproximadamente el 31%-34% de los pacientes que reciben 5-FU experimentan toxicidad grado 3-4 y se estima que la toxicidad es fatal en aproximadamente el 0,5% de los pacientes⁸³. La capecitabina tiene un perfil de toxicidad similar al del 5-FU administrado en infusión continua. El síndrome mano-pie constituye el efecto adverso más característico, aunque también son comunes la diarrea, náuseas, vómitos y la toxicidad hematológica⁸⁴⁻⁸⁹. La Tabla 2 resume las reacciones adversas más frecuentes ($\geq 1/10$) asociadas al tratamiento con 5-FU y capecitabina⁹⁰.

La asociación de 5-FU y capecitabina con otros fármacos citotóxicos con el fin de mejorar la efectividad, puede conllevar el incremento y potenciación de ciertos efectos adversos, así como poner de manifiesto toxicidades específicas de los fármacos concomitantes. La toxicidad más frecuente del oxaliplatino es la neuropatía mientras que, del irinotecan, las toxicidades más frecuentes son diarrea, deshidratación y neutropenia severa de manera que, combinada con la toxicidad propia de la fluoropirimidina, hace que el riesgo de toxicidad hematológica y de diarrea se incremente⁹¹. La administración de cetuximab y panitumumab ha sido asociada con reacciones infusionales severas y toxicidad cutánea. El bevacizumab, por su parte, es generalmente bien tolerado aunque ha sido asociado con el desarrollo de hipertensión reversible y proteinuria⁹².

Predecir el riesgo individual de los pacientes frente a la toxicidad podría potencialmente mejorar la calidad de vida de los mismos mediante la selección e individualización del tratamiento. Los pacientes con alto riesgo de toxicidad frente a un fármaco en concreto podrían recibir dosis reducidas o un fármaco alternativo. Por el contrario, pacientes con bajo riesgo de padecer toxicidad podrían recibir de forma segura dosis plenas^{74,93}.

Tabla 2. Reacciones adversas más frecuentes asociadas a 5-FU y capecitabina.

Fármaco	Reacciones adversas muy frecuentes ($\geq 1/10$)
5-FU	<ul style="list-style-type: none"> -Anomalías isquémicas -Mielodepresión, neutrocitopenia, trombocitopenia, leucocitopenia, agranulocitosis, anemia y pancitopenia -Mucositis (estomatitis, esofagitis, faringitis, proctitis), anorexia, diarrea acuosa, náuseas, vómitos. -Alopecia. Síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar (síndrome mano-pie) con perfusión prolongada y continua a dosis altas -Hiperuricemia -Retraso en la cicatrización de heridas, epistaxis, fatiga, debilidad general, cansancio y falta de energía -Broncoespasmo, inmunodepresión con un mayor riesgo de infección
Capecitabina	<ul style="list-style-type: none"> -Anorexia -Diarrea, vómitos, náuseas, estomatitis, dolor abdominal -Síndrome eritrodistesia palmo-plantar -Fatiga, astenia

1.4.- Variabilidad interindividual en la respuesta a medicamentos

La variabilidad poblacional que existe en la respuesta terapéutica, tanto en la eficacia como en la aparición de toxicidad, es conocida para una gran proporción de fármacos. Además, las consecuencias de esta variabilidad pueden ser en ocasiones peligrosas, en particular para fármacos de rango terapéutico estrecho, o en otras ocasiones limitar significativamente la utilidad de algunos tratamientos⁹⁴. En unos casos la terapéutica no es suficientemente eficaz, en otros aparecen efectos adversos y, algunas veces, ambos problemas se dan simultáneamente.

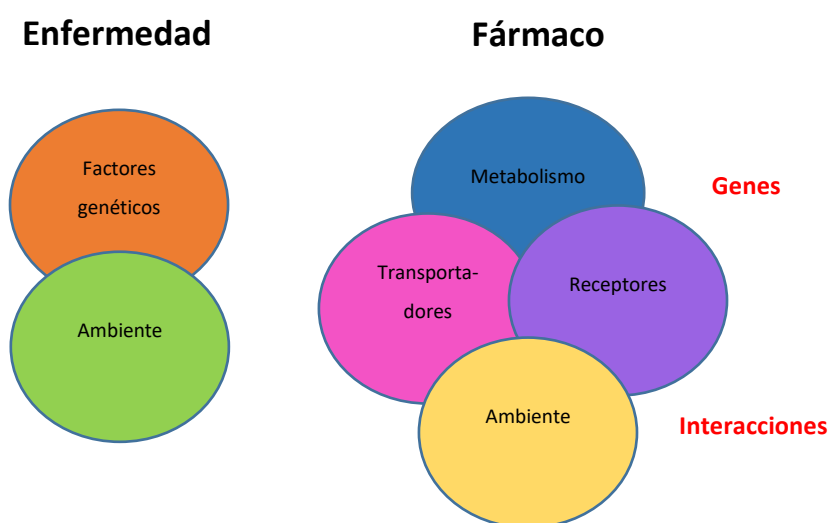
Se sabe que, algo más de 1 de cada 3 pacientes, dependiendo del proceso patológico, no responde adecuadamente al tratamiento, a pesar de tener un diagnóstico y una terapéutica supuestamente acertados. Esto conlleva una atención sanitaria deficiente y también la generación de costes innecesarios^{95,96}.

Estos resultados en salud ocurren a pesar de los estrictos requisitos que deben cumplir los medicamentos para ser aprobados, en parte debido a las condiciones ideales en las

que se desarrollan los ensayos clínicos. Esto pone de manifiesto la necesidad de establecer cuál es el resultado real de su utilización en la población y desarrollar herramientas que permitan controlar esa variabilidad en la respuesta a los fármacos para poder optimizar al máximo los beneficios de los tratamientos⁹⁷. En cualquier caso, sería siempre deseable que la variabilidad de respuesta pudiera reducirse al mínimo, tendiendo a que la prescripción de medicamentos resulte en un proceso de efecto predecible.

La respuesta a los fármacos se encuentra determinada por múltiples factores como la edad, sexo, peso, comorbilidades, dieta, hábitos como el tabaquismo, interacciones medicamentosas, adherencia al tratamiento, etc. Pero considerar únicamente estos factores puede ser insuficiente y la variabilidad interindividual es, además, desde el punto de vista genético, un tracto complejo en el que diversos genes y el ambiente interactúan⁹⁸ (Figura 6).

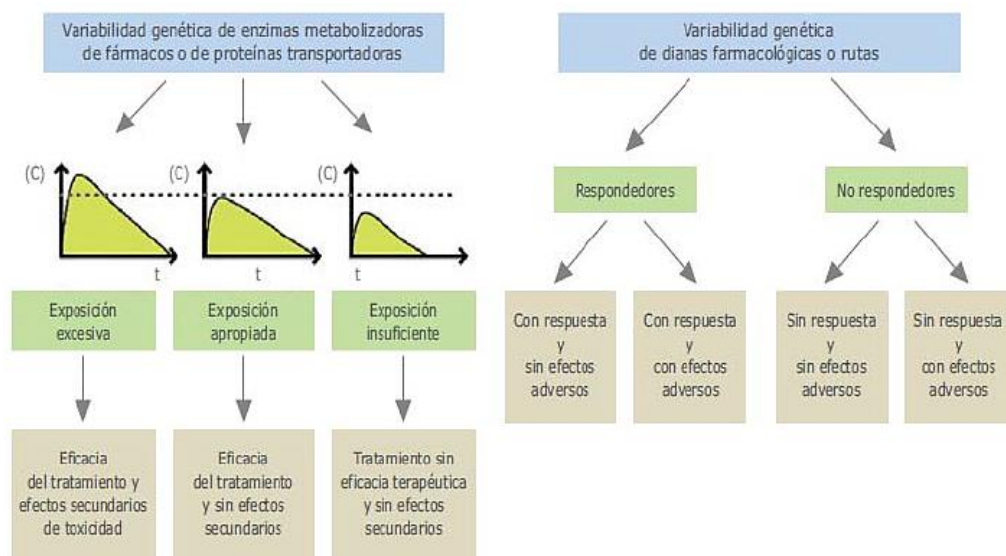
Figura 6. Variación individual en la respuesta a un fármaco.



La respuesta a fármacos está mediada fundamentalmente a través de procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos que determinarán en qué medida el principio activo llega a la biofase e interactúa con su receptor para desencadenar una respuesta. Existen variaciones genéticas en cada uno de los genes implicados en las etapas de

absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos^{99,100}. Dichas variaciones pueden conducir a una actividad enzimática reducida o incluso ausente y, en algunos casos, a una actividad aumentada. Esto puede provocar diferencias muy importantes en las concentraciones plasmáticas de los fármacos y a que la acción farmacológica varíe de unos individuos a otros dentro de una población^{101–103}. Asimismo, la unión entre el fármaco y su diana depende de la medida en que esta proteína se encuentre expresada en la biofase por lo que variantes genéticas en los genes que codifican para el receptor, transportador o enzima diana van a producir también alteraciones en la respuesta farmacológica¹⁰⁴ (Figura 7).

Figura 7. Influencia de la variabilidad genética en la respuesta y la disposición de fármacos.



No se sabe cuántos genes están implicados desde el momento en que un fármaco y un organismo humano se ponen en contacto. Lo que sí se sabe es que el perfil genético germinal del individuo permanece estable a lo largo de la vida, a diferencia de otras variables demográficas, clínicas y medioambientales influyentes en respuestas farmacológicas, con excepción de los tumores^{105,106}. Por otra parte, se ha demostrado que no más del 0,1% de variación en el genoma humano es el responsable de la variabilidad genética y fenotípica entre individuos^{107,108}.

Se ha postulado que conocer las variantes genéticas de los individuos podría permitir que al menos la mitad de las respuestas inadecuadas a fármacos fueran predecibles y, por lo tanto, evitables, siendo éste uno de los objetivos de la farmacogenética¹⁰⁹.

1.5.- Farmacogenética

En 1959 Vogel fue el primero en utilizar el término “farmacogenética”, y junto con el americano Motulsky, sentaron ese mismo año las bases teóricas de la misma, basándose en la observación de diferencias interindividuales en la actividad de enzimas metabolizadoras de fármacos que explicaban efectos secundarios a los mismos y que a su vez variaban en diversas poblaciones humanas. Posteriormente en 1962, Kalow lo definió como el estudio de la herencia relacionada a la respuesta a medicamentos¹¹⁰.

Pero la gran revolución vino de la mano del Proyecto Genoma Humano, particularmente a partir de su finalización en el año 2001. El descubrimiento masivo de SNPs (Polimorfismos de Nucleótido Único o, del inglés, *single nucleotide polymorphisms*), el proyecto HapMap, y el desarrollo de tecnologías de genotipado y de análisis de expresión, posibilitaron que se encontraran numerosísimos ejemplos de genes relacionados con la respuesta a fármacos. Además, las mejoras en las herramientas bioinformáticas para el procesamiento de grandes cantidades de datos y otras tecnologías avanzadas, generaron grandes expectativas respecto al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento basadas en la información genética propia del individuo. Fruto de ello, en la farmacogenética, es el proyecto PharmGKB (*The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base*⁴⁰) que realiza una puesta al día sistemática de todas las variantes genéticas asociadas a respuesta a fármacos, así como su grado de evidencia y su situación regulatoria.

A finales del año 2007, la EMA y la FDA acordaron definir la farmacogenética como la ciencia que se encarga del estudio de la influencia que ejercen las variaciones de la secuencia de ADN en la respuesta a un fármaco¹¹¹.

1.5.1.- Principios básicos

Se define como gen la secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de una molécula de ARN con una función específica en el organismo. En general, de cada gen tenemos dos copias, una de origen materno y otra paterno, o lo que es lo mismo, podemos decir que tenemos dos alelos que conforman un genotipo. Así, un individuo heterocigoto tiene los dos alelos distintos y un individuo homocigoto tiene los dos alelos idénticos. El alelo más común en una población se denomina “salvaje” o *wild type* (WT). El rasgo que resulta del producto proteico codificado por un gen hace referencia al fenotipo.

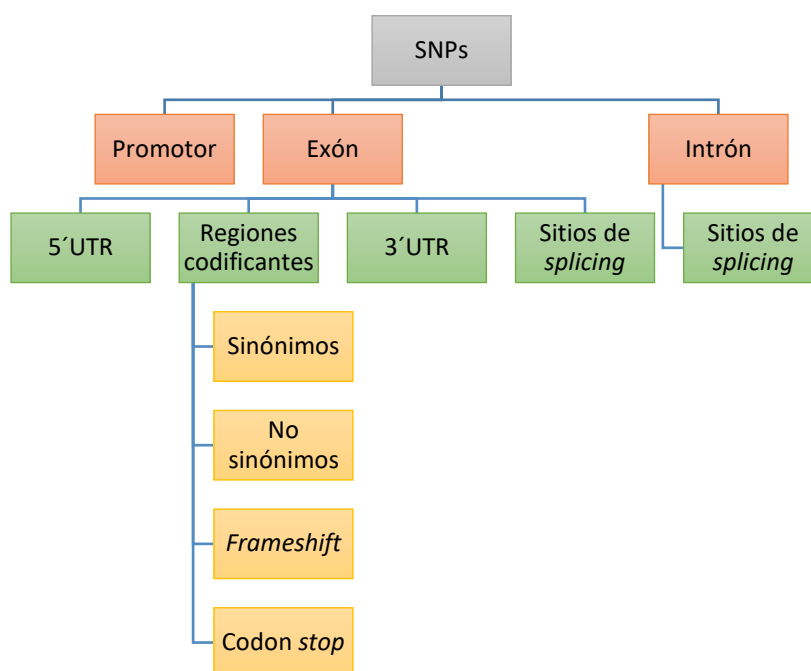
Entendemos como variación genética aquellos cambios que se producen en la secuencia de bases del ADN que pueden involucrar desde un único nucleótido hasta porciones relativamente extensas del genoma. Las variaciones genéticas, mutaciones o polimorfismos pueden ser germinales (presentes en los gametos que originaron el organismo y por lo tanto también en todas la células) y somáticas (originadas de forma espontánea durante la vida del organismo, por ejemplo en un cáncer). Así, las primeras suelen ayudar a predecir la eficacia y toxicidad farmacológica mientras que las segundas a menudo permiten optimizar la elección del agente quimioterápico mediante la selección de dianas específicas^{112,113}. Los tumores tienen una tasa de crecimiento y replicación muy alta, y por tanto muchas probabilidades de desarrollar mutaciones que, por otra parte, le sirven a menudo para escapar de los mecanismos de control de la proliferación.

La variación genética puede originarse por inserciones, deleciones, inversiones o variaciones en el número de copias de un fragmento de ADN de tamaño variable (CNV), siendo las variaciones genéticas más frecuentes los SNPs, originados por la variación de un solo nucleótido de la secuencia, y que representan el 90% de la variabilidad genética¹¹⁴.

Se estima que en el genoma humano puede haber más de 10 millones de SNPs, los cuales pueden localizarse en genes o en regiones intergénicas. Dentro de los primeros, podemos localizarlos en la región promotora, exones (5'UTR, regiones codificantes y 3'UTR) o en intrones. Los SNPs localizados en regiones codificantes pueden ser

sinónimos, si el cambio de nucleótido no produce un cambio de aminoácido; no
 sinónimos, si el cambio de nucleótido produce un cambio de aminoácido; alteraciones
 en el marco de lectura (del inglés, *Frameshift*) y codones de parada o *stop* que se
 traduzcan en modificaciones de la actividad enzimática, la estabilidad de la proteína o la
 afinidad de unión por su ligando¹¹⁵⁻¹¹⁸. Además, podemos encontrar variantes en sitios
 de *splicing*, los cuales pueden estar en el principio o final de un exón y en el final o
 principio de un intrón afectando al procesamiento del ARNm (Figura 8)¹¹⁹. Cada uno de
 ellos puede afectar, en último término, a la cantidad y actividad de las proteínas
 codificadas por los respectivos genes con consecuencias en la eficacia y seguridad de los
 fármacos^{117,120}.

Figura 8. Localización de los SNPs en genes y clasificación de aquéllos localizados en regiones
 codificantes.



1.5.2.- Estrategias para la búsqueda de biomarcadores farmacogenómicos

Los biomarcadores genómicos se definen como una característica medible del ADN o del ARN que es indicadora de un proceso biológico normal, de un proceso patogénico y/o de una respuesta a una intervención terapéutica o de otro tipo⁹⁰.

La identificación de biomarcadores en farmacogenética, es decir, en el ADN, se puede realizar mediante diferentes estrategias como son la selección de SNPs en genes que se conoce que interaccionan con el fármaco en cuestión, también llamados genes candidatos, o bien mediante estrategias que analicen todo el genoma por igual, como por ejemplo los estudios GWAS, del inglés, *genome wide association study*.

1.5.2.1.- Estudios de asociación de genes candidatos

Los estudios por genes candidatos parten de la hipótesis de que variaciones en genes que participan en la ruta del fármaco pueden afectar a su eficacia/toxicidad. De esta forma, su principal limitación es la dependencia del conocimiento existente en un momento concreto acerca de esa farmacología en cuestión. Los resultados positivos son fáciles de interpretar y pueden proporcionar información clínicamente útil. Sin embargo, los resultados negativos a veces son más difíciles de interpretar ya que muchos estudios carecen del suficiente tamaño muestral para detectar efectos, teniendo en cuenta el alto número de variables analizadas por lo general¹¹².

La estrategia a seguir en este tipo de estudios puede ser directa e indirecta. La forma directa consiste en catalogar variantes conocidas y funcionalmente implicadas en regiones reguladoras o codificantes de genes, con la esperanza de que este repertorio contenga cambios que confieran susceptibilidad a la enfermedad o a la respuesta a un fármaco. Esta estrategia es la más seguida y la que ha dado mayores frutos en farmacogenética. Sin embargo, a menudo el conocimiento adquirido no alcanza para explicar el grado de variabilidad observado por lo que se utiliza una forma indirecta. En este caso, como alternativa, se pueden utilizar métodos que representen toda o una gran parte de la variabilidad existente. Esto implica la inclusión, entre otras, de variantes neutrales, es decir, aquellas que a priori no contribuyen a una variación fenotípica o ésta se desconoce pero que se encuentran correlacionados genéticamente con las variantes genéticas funcionales que pueden estar contribuyendo a un determinado rasgo o enfermedad¹²¹. Cuando 2 o más variantes genéticas se transmiten frecuentemente juntas se dice que están en desequilibrio de ligamiento, del inglés, *Linkage Disequilibrium* (LD). Esto implica que, si la variante causal no se selecciona para el

genotipado, pero sí se selecciona una variante cercana y ambas están en LD, entonces la segunda se asociará con el efecto analizado en el estudio caso-control. Estas variantes cercanas a las potencialmente causales se denominan *tags* y se definen como variantes de las que se dispone de información previa, obtenida de estudios de ligamiento, y que a su vez pueden ligarse a alelos de susceptibilidad¹²².

Esta estrategia indirecta de selección de SNPs en los estudios de asociación genética es una de las más utilizadas, sobre todo desde la constitución del Proyecto HapMap, que mediante el análisis inicial de SNPs, cataloga los patrones haplotípicos basándose en que el genoma humano se divide en bloques de alto LD o baja diversidad haplotípica, separados por puntos de elevada recombinación (*hotspots*) que rompen el desequilibrio^{123,124}. De esta manera, el HapMap proporciona la información de los tag-SNPs, considerados como el conjunto mínimo de SNPs necesarios para detectar un haplotipo permitiendo establecer el mínimo grupo de marcadores necesario para recoger la práctica totalidad de variación genética en una región determinada, lo que se denomina *tagging*^{125,126}. Con la realización de un *tagging*, se podría detectar asociación, si esta existiese, con cualquiera de las variantes presentes en esta región.

Existen varios algoritmos bien conocidos para seleccionar tag-SNPs^{127,128}, así como herramientas que facilitan la selección de los mismos en un espacio de tiempo considerablemente corto con respecto a lo que supondría su selección manual. Los datos que estos servicios web administran y procesan contienen la información relevante de las últimas versiones de HapMap y Ensembl, entre otros^{123,129–131}.

La implantación de estos estudios de selección de tag-SNPs en la investigación para la identificación de nuevos polimorfismos asociados a un mayor riesgo de CCR se ha empezado a poner de manifiesto en los últimos años con resultados favorables^{132–137}. Este tipo de estudios, aunque cada vez más asequibles, requiere a día de hoy de importantes recursos tanto humanos como financieros, pero suponen también un paso importante hacia la caracterización de variables clínicamente relevantes¹³⁸.

1.5.2.2.- Estudios de genoma completo

Cuando se desconoce total o parcialmente la ruta en el organismo de un determinado fármaco, la estrategia para identificar biomarcadores tiene que englobar a todo el genoma y no priorizar ningún gen.

Por un lado, los estudios de asociación de genoma completo o GWAS han llevado recientemente a la identificación de decenas de *loci* en el genoma humano que están asociados con la susceptibilidad a padecer numerosas enfermedades complejas y relacionados, en muchas ocasiones, con el efecto de los fármacos^{139,140}. Estos modelos están teniendo un éxito particular porque parten de la hipótesis de que cualquier variación genética en el genoma puede contribuir a la variación en la respuesta al fármaco e investigan la asociación entre la variación genética común y un determinado carácter sin exigir ideas predefinidas sobre la causa de la enfermedad¹⁴¹.

Estos estudios se basan en el empleo de una gran selección de marcadores genéticos, principalmente SNPs, repartidos a lo largo de todo el genoma, que capturan una elevada variabilidad genética por LD, comparando la actividad de múltiples genes en individuos con un fenotipo e individuos con otro fenotipo distinto⁹⁵. Debido a estas características, carecen del sesgo de selección de los estudios por genes candidatos y pueden identificar varios polimorfismos que contribuyan al efecto. Su principal limitación es que requieren tamaños muestrales muy elevados y generalmente es difícil interpretar los resultados positivos encontrados¹⁴².

Los GWAS han mejorado notablemente desde su aparición y la existencia de centros de genotipado masivo en muchos países (en España, el Centro Nacional de Genotipado¹⁴³) ha facilitado a los científicos el acceso a este tipo de estudios y mejorado la calidad de los mismos. En el caso del CCR se han descubierto marcadores asociados a toxicidad mediante esta técnica¹⁴⁴. No obstante, la evolución en el campo de la farmacogenética es compleja y también lo es su implementación en clínica que, a pesar de su gran potencial para mejorar el resultado clínico de los pacientes, está siendo un proceso muy lento.

Por otro lado, las técnicas de secuenciación, han experimentado un importante desarrollo recientemente en cuanto a la longitud y el número de los fragmentos

secuenciados y a la rapidez en su secuenciación y han dado lugar a la denominada secuenciación paralela o de siguiente generación (NGS, del inglés, *next generation sequencing*)¹⁴⁵. La NGS se está aplicando a la secuenciación del genoma completo y de la región codificante, también conocida como exoma en el que se encuentra el 85% de las enfermedades hereditarias^{146,147}. Esta técnica está permitiendo el estudio de genomas completos humanos o de otras especies poniendo de manifiesto las diferencias interindividuales. Sin embargo, también se puede enfocar al estudio de genes específicos, es decir, a genes candidatos, en lo que se conoce como paneles de genes. Así, la NGS abre nuevos horizontes para la comprensión de la variación genómica humana, revelando la secuencia codificante y proporcionando una visión global del mapa genómico¹⁴⁸.

La NGS está basada en la secuenciación masiva de moléculas de ADN amplificadas de forma paralela¹⁴⁹. A través de distintos ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de sucesivos ligamientos de oligonucleótidos, se obtiene la secuencia de cientos de millones de bases individuales. Posteriormente estas secuencias son ensambladas a un genoma o secuencia de referencia, lo que permite secuenciar múltiples genes, regiones específicas o incluso un genoma completo^{150,151}.

Recientemente, la secuenciación masiva ha sido empleada en la investigación en CCR creando importantes expectativas en la identificación de variantes poco frecuentes que expliquen los efectos observados^{88,152–154}.

1.6.- Farmacogenética de las reacciones adversas a fluoropirimidinas en cáncer colorrectal

Aunque son varios los fármacos y grupos terapéuticos utilizados en el tratamiento del CCR, las fluoropirimidinas siguen constituyendo la base fundamental de la terapia⁸⁹. Por esta razón, es el grupo más estudiado a nivel farmacogenético.

La ruta farmacocinética y farmacodinámica de la capecitabina y del 5-FU es bien conocida y los genes que forman parte de ella presentan a menudo un grado de variabilidad que puede jugar un importante papel en la eficacia/toxicidad (Figuras 4 y 5).

Sin embargo, a pesar del gran número de publicaciones al respecto, sólo unos pocos polimorfismos han desarrollado un alto nivel de evidencia científica. El interés, como es lógico, se ha centrado en la búsqueda de marcadores farmacogenéticos de eficacia a tratamientos basados en fluoropirimidinas. Sin embargo, la elevada toxicidad de estos tratamientos y la limitación que tiene ésta sobre la adecuada administración de la terapia ha hecho que se busquen también biomarcadores de toxicidad.

La gran mayoría de los estudios de farmacogenética de las reacciones adversas al tratamiento con fluoropirimidinas se centran en unos pocos genes, entre los que se encuentran *DPYD*, *TYMS* y *MTHFR*, a los cuales se les suele añadir *CDA* en el caso de que la fluoropirimidina estudiada sea capecitabina. De igual modo, dado que el tratamiento con una fluoropirimidina es a menudo combinado con oxaliplatino o irinotecan, en estos estudios es frecuente también analizar polimorfismos en genes como *XRCC1* o *GSTP1* en el caso de oxaliplatino y *ABCB1* o *UGT1A1*, en el caso de irinotecan^{155–157}.

A continuación, se describen las mayores evidencias en la farmacogenética de las reacciones adversas a fluoropirimidinas de los genes más estudiados y algunos resultados no tan validados en genes menos estudiados.

1.6.1.- Dihidropirimidina deshidrogenasa

La *DPYD* es la enzima responsable de la inactivación de más del 80% del 5-FU a nivel hepático y la más estudiada en relación a la toxicidad a fluoropirimidinas (Figura 4)⁵². Bajos niveles de expresión de *DPYD*, o la expresión de una *DPYD* defectuosa se correlacionan con mayores niveles de 5-FU y por lo tanto con una mayor respuesta al tratamiento. Sin embargo, estos altos niveles de 5-FU, debidos a un metabolismo deficiente de las pirimidinas, provocan una elevada toxicidad que puede llegar a ser mortal^{158,159}.

Se estima que un 3% de la población es portadora de mutaciones en heterocigosis en *DPYD* que la inactivan, mientras que un 0,1% son homocigotos para estas mutaciones. Estos individuos, con baja o nula actividad enzimática, deberían ser candidatos a tratamiento con dosis reducidas de fluoropirimidinas o con fármacos alternativos¹⁶⁰.

Se han descrito multitud de variaciones en la región codificante de *DPYD*, sin embargo sólo unas pocas han demostrado reducir la actividad enzimática¹⁶¹. Las variaciones genéticas más claramente asociadas con la toxicidad a fluoropirimidinas hasta la fecha son *DPYD**2A (c.1905+1 G>A; rs3918290), D949V (c.2846A>T; rs67376798) y *DPYD**13 (c.1679 T>G, rs55886062). *DPYD**2A es la variación más estudiada y sucede por transición de G a A en sitio de *splicing* del exón 14 provocando una delección de este exón y por lo tanto la generación de una proteína truncada que es degradada por el proteosoma¹⁶². Por su parte, las variaciones rs67376798 y rs55886062 dan como resultado una sustitución aminoacídica Asp949Val e Ile560Ser en *DPYD*, respectivamente, generando una proteína con una funcionalidad muy disminuida¹⁶³.

La asociación entre el riesgo de toxicidad por fluoropirimidinas y la presencia de estas 3 variantes está ampliamente descrita^{164–166}. Como consecuencia se han elaborado guías de práctica clínica y test farmacogenéticos pre-terapéuticos para prevenir la toxicidad a fluoropirimidinas, que además han demostrado ser coste-efectivos^{76,167}. Estas guías de práctica clínica recomiendan el genotipado de estas 3 variantes en *DPYD* y proporcionan recomendaciones en cuanto a la dosificación de las fluoropirimidinas de manera que los pacientes homocigotos para cualquiera de estas variantes no funcionales en *DPYD* son claros candidatos a tratamiento con fármacos alternativos y los pacientes heterocigotos deberían iniciar el tratamiento con un 50% o menos de las dosis establecidas para individuos no portadores de las mismas¹⁶⁸. Estas dosis iniciales deberán ser tituladas estableciéndose incrementos o reducciones en función de la tolerabilidad y toxicidad.

A pesar de estos avances en la prevención de toxicidad por déficit de *DPYD* se ha comprobado que la ausencia de cualquiera de estas 3 variantes no garantiza una ausencia de deficiencia de *DPYD* y confirma que otras variantes deben jugar un papel muy importante en la funcionalidad de la proteína¹⁶⁹. Otra variante que está cerca de ser útil en la clínica pero que no acaba de ser implementada es la c.1236G>A/HapB3¹⁷⁰. Por su parte, otras variantes como *DPYD**3 (rs72549303), *DPYD**7 (rs72549309), *DPYD**8 (rs1801266) *DPYD**9B (rs1801266 y rs1801267), *DPYD**10 (rs1801268), *DPYD**11 (rs72549306) y *DPYD**12 (rs80081766 y rs78060119) no llegan al nivel de evidencia que haga dar recomendaciones sobre su genotipado por lo que se necesitan nuevos datos sobre ellas⁴⁰. El resto de las numerosas variantes de *DPYD*, algunas

ampliamente estudiadas, no han demostrado una clara e inequívoca relación con toxicidad. Los resultados discrepantes obtenidos a menudo en el estudio de estas variantes pueden ser debidos a múltiples factores como la naturaleza retrospectiva en la mayoría de los estudios, un tamaño muestral insuficiente y la heterogeneidad de los protocolos de tratamiento. Todo ello ha limitado su utilidad en la práctica clínica^{74,171-174}.

Por este motivo, es necesario identificar otras variantes en *DPYD*, conocidas o no, que contribuyan a la deficiencia de *DPYD* y por lo tanto a la toxicidad severa a fluoropirimidinas. Por otro lado, multitud de trabajos han puesto de manifiesto que aproximadamente entre un 33-66% de pacientes con toxicidad severa presentan un fenotipo normal de la enzima *DPYD*, lo que sugiere que además de esta enzima existen otras que determinan la toxicidad a estos fármacos^{175,176}.

1.6.2.- Timidilato sintasa

La enzima *TYMS* es la diana del 5-FU. La sobreexpresión de *TYMS* se ha relacionado con un peor pronóstico y falta de respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas, mientras que la baja expresión se relaciona con un exceso de 5-FU libre y por lo tanto con toxicidad¹⁷⁷.

Se han descrito variantes en *TYMS* que regulan los niveles de expresión. Así se han estudiado exhaustivamente dos polimorfismos en el *enhancer* de la región promotora de *TYMS* (TSER) y uno en la región 3'UTR. Uno de los polimorfismos de la región promotora (rs34743033) consiste en repeticiones en tándem de 1 a 4 veces de una secuencia de 28 pares de bases, siendo lo más frecuente 2 o 3 repeticiones. Se ha observado una correlación positiva entre el número de repeticiones y los niveles de ARNm de *TYMS* y la expresión de la proteína. Por lo tanto, pacientes homocigotos para 3 repeticiones de esta secuencia en TSER tendrían una actividad de la enzima de 2 a 4 veces mayor y peor pronóstico y respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas que pacientes homocigotos para 2 repeticiones. Además, en este fragmento repetido puede haber un SNP (C>G) en la posición 12 y se asocia con un nivel de expresión de *TYMS* 2,6 veces superior al del alelo con 2 repeticiones en TSER, tanto *in vitro* como en el tumor¹⁷⁸.

Por último, otro SNP estudiado en *TYMS* consiste en una delección de 6 pares de bases y se localiza en la posición 1494 de la región 3'UTR, la cual está relacionada con la regulación del gen a nivel postranscripcional a través del control de la estabilidad del ARNm. Este polimorfismo, rs34489327, se asocia con una reducción en la estabilidad del ARNm *in vitro* y una expresión reducida de la proteína TYMS en el tejido tumoral en CCR¹⁷⁹.

La mayoría de estudios farmacogenéticos con estas variantes se han centrado en la efectividad y en los pocos en los que se ha estudiado la toxicidad no se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas de manera independiente. Los resultados sí que han sido positivos cuando se han combinado polimorfismos en *TYMS* con otros en genes como *MTHFR*¹⁸⁰ o *DPYD*¹⁸¹. En este último estudio, se ha propuesto un algoritmo para evitar reacciones adversas severas a capecitabina. Sin embargo, el valor predictivo positivo es claramente insuficiente, no superando el 50%, por lo que, de nuevo, se hace necesario la identificación de nuevas variantes.

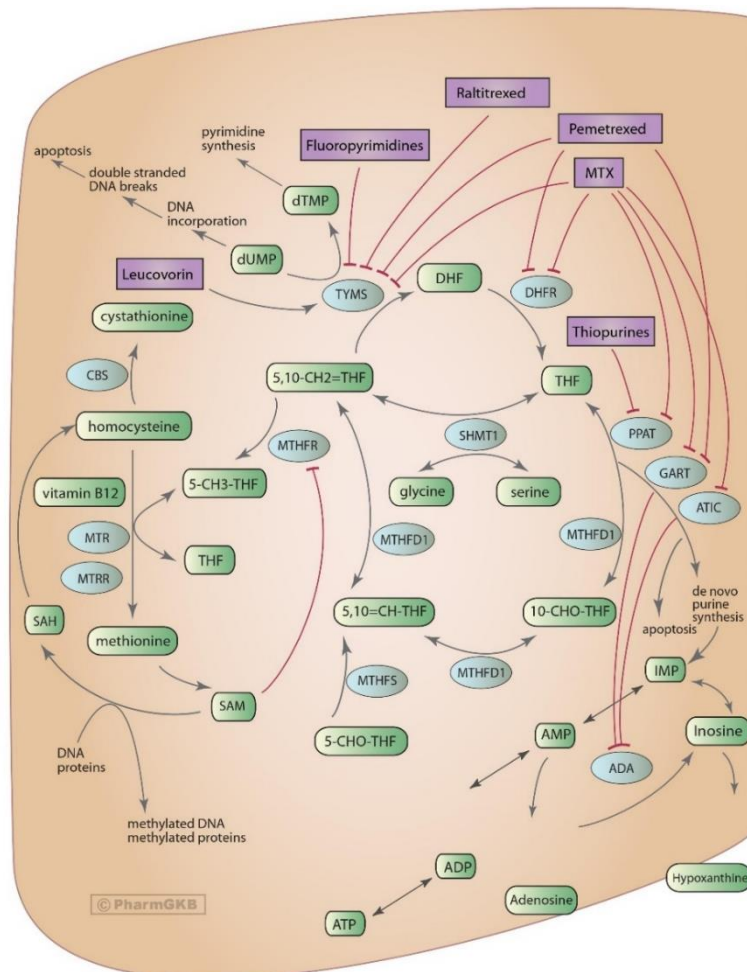
1.6.3.- Metilentetrahidrofolato reductasa

MTHFR es una enzima clave en la homeostasis y en la regulación del folato intracelular, esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Su papel principal es catalizar la transformación de 5,10-CH₂-THF a 5-metilentetrahidrofolato (5-CH₃-THF), este último sirve como un donante de grupos metilo necesario para la conversión de homocisteína en metionina y subsecuente producción de S-adenosilmetionina (SAM). SAM es el donador universal de grupos metilo en humanos y es necesario para múltiples reacciones de metilación en la célula, entre ellas la metilación del ADN (Figura 5 y Figura 9)^{182,183}.

Los polimorfismos más frecuentes y estudiados en *MTHFR* son C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131). En la población general, el 60-70% de los individuos presenta al menos una de estas variantes en homocigosis o heterocigosis^{184,185}.

La variante C677T ha sido asociada con una disminución de la actividad de MTHFR, con un incremento de los niveles de homocisteína y una alteración en la distribución del

Figura 9. Ciclo del folato.



1.6.4.- Citidina deaminasa

La enzima CDA, participa en el proceso de conversión de la capecitabina en 5-FU. Lógicamente, una elevada capacidad de conversión de capecitabina a 5-FU se relaciona con mayores niveles de 5-FU y consecuentemente con una mayor efectividad del tratamiento y una mayor toxicidad asociada al mismo^{193,194}. Ciertos polimorfismos en el gen que codifica esta enzima, como rs3215400, rs532545 y rs2072671, han sido asociados a toxicidad inducida por fluoropirimidinas^{181,195,196}.

De manera similar a la anteriormente mencionada utilización conjunta de polimorfismos en *DPYD* y *TYMS* para predecir toxicidad a fluoropirimidinas, se ha diseñado un algoritmo utilizando polimorfismos en *CDA* y *ABCB1* con resultados muy parecidos¹⁹⁷. Sin embargo, hacen falta más estudios para confirmar estas asociaciones y mejorar el poder predictivo de estas pruebas.

1.6.5.- Otros genes implicados en la ruta de las fluoropirimidinas

La ruta de las fluoropirimidinas, como se ha comentado previamente, es bien conocida y proporciona al menos 33 genes candidatos (Figuras 4 y 5). No obstante, no todos los genes integrantes de la ruta han sido estudiados en igual medida, siendo en algunas ocasiones, escasas o nulas las evidencias que existen en relación a algunos de ellos y su asociación con toxicidad de las fluoropirimidinas. En ningún caso estas variantes tienen un nivel de evidencia suficiente para ser aplicadas a la práctica clínica y se tienen que considerar en fase exploratoria.

Las carboxilesterasas *CES1* y *CES2*, cuyos niveles son variables en función de la localización tisular, participan en el primer paso de la conversión de capecitabina a 5-FU¹⁹⁸. Se han identificado varios polimorfismos asociados a reacciones adversas severas al tratamiento con capecitabina^{199,200}. Recientemente, se han identificado 5 variantes en *CES1* que podrían contribuir en la toxicidad precoz a capecitabina²⁰¹. Por su parte, las variantes 6046G>A y rs11075646 en *CES2* han sido asociadas a diarrea de grado 3-4 y a síndrome mano-pie, respectivamente^{202,203}.

Algunos autores han comprobado que los niveles de TYMP suelen estar más elevados en el tejido tumoral que en el tejido normal adyacente²⁰⁴. Una elevada expresión intratumoral de TYMP se ha asociado frecuentemente con una falta de respuesta a quimioterapia del 5-FU, a pesar de su contribución en la activación de este fármaco. El polimorfismo más estudiado hasta la fecha en relación al riesgo de toxicidad ha sido el rs11479. Así, se ha demostrado que los pacientes con genotipo AA o AG podrían tener un mayor riesgo de toxicidad farmacológica, así como de necesidad de modificación posológica tras el tratamiento con fluoropirimidinas en comparación con los pacientes con genotipo GG²⁰⁵. Este polimorfismo junto con rs470119 también ha sido relacionado con impacto en la supervivencia global²⁰³.

El gen más estudiado en la activación del 5-FU ha sido *UMPS*. En este gen, el polimorfismo rs1801019 se ha asociado a una actividad incrementada de la enzima y a toxicidad hematológica y diarrea inducidas por 5-FU¹⁸¹.

La enzima TK1 también ha sido investigada y se han identificado ciertos polimorfismos que podrían contribuir a toxicidad asociada a fluoropirimidinas como es rs8071253²⁰⁶. La sobrerregulación que ha mostrado en ciertos tejidos tumorales, constituye esta enzima como una diana potencial en la terapia^{207,208}.

La etapa limitante del catabolismo de 5-FU, como se comentó previamente, es la conversión de 5-FU a DHFU por la *DPYD*. El DHFU se convierte entonces en fluoro-beta-ureidopropionato (FUPA) y posteriormente en FBAL por la acción de la *DPYS* y *UPB1*, respectivamente²⁰⁹. La deficiencia en enzimas en esta vía puede resultar en toxicidad severa e incluso fatal de 5-FU. Aunque las variaciones en *DPYD* han sido las más investigadas, las variantes en *DPYS* también han demostrado influir en la toxicidad de 5-FU²¹⁰. Se demostró que una variante rara en *DPYS* (833G>A, Gly278Asp) en el exón 5 era la variante determinante de toxicidad severa en un paciente que recibía 5-FU²¹¹. Otras variantes en *DPYS* como 1635delC y Leu7Val han demostrado *in vitro* dar lugar a una actividad enzimática reducida²¹². Más recientemente, se han identificado las variantes 253C>T, 1217G>A, c.1-1T>C y c.265-58T>C que podrían explicar la toxicidad severa en una cohorte de pacientes²¹³. Las alteraciones en el gen *UPB1*, que codifica la enzima que cataliza el paso final en la vía catabólica de 5-FU, no se han estudiado tan extensamente

como las anteriores y sólo unas pocas como c.872_873+11del13 y c.-80C>G (rs2070474) han sido asociadas a toxicidad por 5-FU²¹⁴.

ENOSF1 (enolasa superfamilia M1), a pesar de no ser un gen integrante de la ruta de las fluoropirimidinas, se ha propuesto recientemente como un regulador de la expresión de *TYMS* a través de mecanismos antisentido, ya que las secuencias de ambos genes están solapadas⁸⁸. Una de las variantes más estudiadas, rs2612091, ha sido asociada a toxicidad severa relacionada con capecitabina, principalmente síndrome mano-pie, observándose un mayor riesgo de esta reacción adversa en pacientes portadores de la variante G en homocigosis¹⁹⁷.

Hasta la fecha no se ha descrito asociación alguna con reacciones adversas severas a 5-FU en muchos otros genes de la ruta de fluoropirimidinas, como por ejemplo, *XRCC3* o *TP53*. Ningún estudio relaciona de momento tampoco los transportadores de 5-FU con toxicidad a este fármaco, aunque probablemente sea por los pocos trabajos que han estudiado estos genes. Los principales transportadores implicados en la ruta son *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* y *ABCG2* (del inglés, *ATP-binding cassette C3, C4, C5 y G2*) y *SLC29A1* y *SLC22A7* (del inglés, *solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 1* y *solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7*, respectivamente). Los primeros contribuyen en el eflujo celular de múltiples sustratos, entre ellos 5-FU, y, por tanto, en la resistencia farmacológica, mientras que los segundos son responsables de la captación de 5-FU¹⁸². El valor predictivo de los transportadores continúa siendo un aspecto complejo, debido fundamentalmente a la escasez de estudios que evalúen el equilibrio entre la captación-eflujo (evaluación de transportadores ABC y SLC en una misma cohorte de pacientes) y su relación posterior con el metabolismo del 5-FU y/o la interacción con su diana farmacológica²¹⁵. Sería de enorme interés encontrar marcadores de toxicidad a fluoropirimidinas en transportadores de 5-FU.

A pesar de los avances en farmacogenética de las fluoropirimidinas en los últimos años, sólo un pequeño porcentaje de los pacientes que sufren reacciones adversas severas al tratamiento con las mismas son identificados. Por este motivo, se pone de manifiesto la urgente necesidad de realización de estudios mediante nuevos abordajes que permitan identificar nuevas variantes asociadas a toxicidad severa en pacientes tratados con quimioterapia basada en fluoropirimidinas. Para ello en la presente memoria nos disponemos a identificar variantes genéticas asociadas a toxicidad a capecitabina en pacientes con CCR mediante abordajes experimentales no utilizados para este fin, como la selección de tag-SNPs o la secuenciación masiva de exomas aplicada al estudio de genes de la ruta de fluoropirimidinas.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis

La respuesta a fármacos es un proceso altamente complejo en el que intervienen múltiples factores, aunque una buena parte de la variabilidad interindividual observada en la toxicidad se puede deber a la variación genética entre individuos.

En este sentido, el análisis de tag-SNPs podría ser útil para identificar nuevos polimorfismos en genes de la ruta de las fluoropirimidinas que estén asociados a toxicidad severa en pacientes con CCR tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. Por otro lado, la secuenciación masiva de exomas permitiría identificar todas las variantes en genes de esta ruta en pacientes con una elevada toxicidad al tratamiento quimioterápico que contiene capecitabina y ayudaría a comprender los mecanismos asociados a toxicidad y a identificar variantes causantes de la misma.

2.2.- Objetivos

- Identificar polimorfismos genéticos asociados a toxicidad severa al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina mediante el uso de tag-SNPs en genes candidatos en pacientes con CCR.
- Evaluar el impacto de la secuenciación masiva de exomas para identificar variantes genéticas en genes de la ruta de las fluoropirimidinas en pacientes con CCR asociadas con toxicidad severa al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Diseño del estudio

El estudio fue observacional, analítico, prospectivo-retrospectivo de casos y controles.

3.2.- Población de estudio

Se incluyeron pacientes diagnosticados de CCR en cualquier estadio de la enfermedad tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina procedentes de los servicios de Oncología Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Ramón y Cajal.

El periodo de estudio durante el que se incorporaron los pacientes se inició en enero de 2007 y finalizó en septiembre de 2016. Las muestras de pacientes obtenidas en el periodo 2007-2010 procedieron exclusivamente del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Posteriormente se incorporaron muestras del Hospital Universitario 12 de Octubre durante el periodo 2011-2012. Finalmente, las muestras obtenidas desde el año 2013 procedieron de la colección de la Cohorte de Oncología del BioBanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, integrada por muestras de pacientes procedentes de los 4 hospitales participantes.

Los dos estudios desarrollados en el presente trabajo incluyeron distinto número de pacientes en función del momento en el que se llevó a cabo el análisis de los datos. En el estudio de selección de tag-SNPs el análisis de datos se realizó en abril de 2016 e incluyó a 301 pacientes, mientras que el análisis de los datos del estudio de secuenciación masiva de exomas fue posterior, en septiembre de 2016, incluyéndose en este caso a 319 pacientes.

3.2.1.- Criterios de inclusión

- Edad mayor a 18 años.

- Diagnóstico de cáncer de colon o recto.
- Tratamiento quimioterápico con un régimen que contuviera capecitabina en cualquier línea de tratamiento.
- Tener una puntuación ECOG menor o igual a 2.

3.2.2.- Criterios de exclusión

- Duración de tratamiento inferior a 2 meses, siempre que este periodo estuviera libre de reacciones adversas severas. Este criterio se aplicó con el fin de evitar incluir pacientes que hubieran recibido muy pocos ciclos de quimioterapia sin toxicidad importante.

3.2.3.- Aspectos éticos

La participación de los pacientes fue voluntaria. Los oncólogos responsables informaron a los mismos y, en caso de aceptación, se procedió a la firma del consentimiento informado previo a la inclusión de los pacientes y obtención de las muestras biológicas de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica. En el Anexo 1 se muestra, como ejemplo, el consentimiento informado que firmaron los pacientes cuyas muestras forman parte de la Cohorte de Oncología del BioBanco del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, aunque, como se ha comentado previamente, las muestras analizadas proceden también de 2 colecciones previas registradas en el Instituto de Salud Carlos III y cuyo responsable es el Dr. Luis Andrés López Fernández (C.0000990 y C.0001004).

Los Comités Éticos de Investigación Clínica de los hospitales implicados aprobaron tanto la realización del estudio como el consentimiento informado destinado a pacientes.

El estudio se llevó a cabo según lo establecido en la declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000) y sus posteriores actualizaciones y en el Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Oviedo, 1997). Se siguió la Ley Orgánica 15/1999 sobre

protección de datos de carácter personal y la ley 41/2002 reguladora del principio de autonomía y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Al tratarse de un estudio observacional, la participación en el estudio no interfirió en el manejo clínico de los pacientes.

3.3.- Variables del estudio

Se recogieron variables relativas a pacientes y tratamiento recibido mediante revisión de historias clínicas. Se utilizaron Microsoft Access® y Microsoft Excel® como principales aplicaciones para el manejo de datos. La recogida de estos datos se realizó de forma sistemática mediante formularios. Se codificaron las muestras con el fin de preservar la confidencialidad de los pacientes.

3.3.1.- Datos de pacientes

- Edad: variable cuantitativa continua. Toma el valor en años del paciente al inicio del tratamiento con capecitabina a partir de la fecha de nacimiento.
- Sexo: variable cualitativa dicotómica que toma valores hombre o mujer.
- Tipo de cáncer: variable cualitativa dicotómica que toma valores colon o recto.
- Estadío tumoral en el momento del diagnóstico: variable cualitativa politómica. Toma valores 0, I, II, III y IV atendiendo a la clasificación TNM.
- ECOG: variable cualitativa politómica. La principal función de esta escala es la de objetivar la calidad de vida del paciente. Se puntúa con valores de 0 (el paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria) a 5 (paciente fallecido). En este estudio, debido al criterio de inclusión, la variable ECOG toma valores sólo de 0 a 2. Este último valor se define porque el paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la

noche, pero que sin superar el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.

- Hospital: variable cualitativa politómica que toma valores Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Ramón y Cajal.

3.3.2.- Datos del tratamiento

- Línea de tratamiento: variable cualitativa politómica. Puede ser neoadyuvancia, adyuvancia o tratamiento metastásico.

- Tipo de régimen: variable cualitativa dicotómica. Puede ser monoterapia o combinación debido a la asociación de la capecitabina con distintos fármacos citotóxicos concomitantes.

- Fármacos concomitantes: variable cualitativa politómica. Se define como los fármacos que forman parte de un régimen de combinación. Pueden ser: oxaliplatino, irinotecan o anticuerpos monoclonales.

- Motivo de fin de tratamiento: variable cualitativa politómica. Los motivos de fin de tratamiento considerados en el presente estudio fueron petición del paciente, toxicidad inaceptable, progresión, fin de tratamiento, criterio médico, *exitus* y cirugía de rescate.

- Reducción o retraso de dosis y retirada de capecitabina por toxicidad: variables cualitativas dicotómicas que toman valores Sí o No.

3.3.3.- Reacciones adversas y su gradación

Todas las reacciones adversas fueron revisadas de acuerdo a la clasificación CTCAE v4.0 del NCI⁸¹. Esta clasificación permite otorgar un grado que varía de 1 (leve) a 5 (muerte) en función de la severidad y de la reacción adversa analizada.

Las reacciones adversas registradas se detallan en la Tabla 3. No se tuvieron en cuenta reacciones adversas características de otros fármacos, como, por ejemplo, la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino.

La toxicidad cutánea se definió como reacción cutánea acneiforme. La toxicidad hematológica se definió como la presencia de anemia, leucopenia, neutropenia o plaquetopenia.

Tabla 3. Reacciones adversas registradas y su gradación.

Toxicidad	Reacciones adversas (CTCAE v4.0)
Gastrointestinal	Náuseas y vómitos (0-5) Diarrea (0-5) Mucositis y estomatitis (0-5)
Hepática	Hiperbilirrubinemia (0-4) Hipertransaminemia (0-4)
Otras toxicidades	Pérdida de peso y anorexia (0-5) Toxicidad cutánea (0-5) Síndrome mano-pie (0-3) Toxicidad hematológica (0-5) Reacción alérgica (0-5) Astenia (0-3)

CTCAE v4.0, del inglés, *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versión 4.0.

Para el análisis de las reacciones adversas severas, establecidas en esta memoria como aquéllas de grado >2, se definieron las toxicidades como variables binarias de acuerdo a la clasificación NCI CTCAE v4.0 (nula/moderada: grado 0-2 frente a severa: grado 3-5). Se adoptó este criterio por ser el más utilizado en la literatura²¹⁶.

Se registró también la prescripción de factores estimulantes de colonias granulocíticas (GCSF) debido a neutropenia. Se analizó la toxicidad global, definida por la presencia de cualquier reacción adversa de grado superior a 2.

3.4.- Aislamiento de ADN

Se recogieron 3-5mL de sangre de los pacientes reclutados en el estudio en un tubo conteniendo ácido etilendiaminotetracético como anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN genómico se utilizó el *High Pure PCR template preparation kit* (Roche Applied Sciences, Penzberg, Germany) a partir de 200 µL de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante²¹⁷. Posteriormente, tanto las muestras de sangre como las extracciones de ADN fueron conservadas a -80°C.

Se determinó la concentración y la calidad del ADN midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Todas las muestras fueron diluidas a una concentración final de 10 ng/µL.

3.5.- Selección de tag-SNPs

La selección de los SNPs a estudiar fue realizada a través de la herramienta web *Select Your SNPs* (SYSNPs)¹³¹. En la actualidad esta herramienta no está accesible, por lo que los resultados no son verificables. Los genes analizados en el presente estudio fueron: *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* y *UMPS*.

La elección de los tag-SNPs se realizó de acuerdo a los siguientes criterios: *Nonsense Mediated Decay transcript*, *synonymous coding*, *nonsynonymous coding*, *frameshift coding*, *stop gained*, *stop lost*, *5'UTR*, *3'UTR*, *regulatory region*, *splice site*, *essential splice site*, *within mature miRNA* y *500 pb upstream*. Los resultados se filtraron por *tagger type* (*aggressive*), *population* (CEU), *min MAF* (0.05), *R² threshold* (0.8) y *min Genotype* (75). Los SNPs seleccionados a través de esta herramienta se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tag-SNPs seleccionados en *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* y *UMPS*.

Gen	SNP	MAF	Función
CDA	rs12726436	0,094	5'UTR
	rs2072671	0,330	<i>Non Synonymous coding</i>
	rs1048977	0,344	<i>Synonymous coding</i>
CES1	rs2397787	0,207	<i>Downstream</i>
	rs7498748	0,051	<i>Upstream</i>
DPYD	rs291593	0,318	3'UTR
	rs291592	0,491	3'UTR
	rs1042482	0,082	3'UTR
	rs12119882	0,094	<i>Downstream</i>
	rs6668296	0,104	<i>Downstream</i>
	rs4421623	0,156	<i>Downstream</i>
ENOSF1	rs3744962	0,089	<i>Synonymous coding</i>
	rs2612086	0,374	<i>Non synonymous coding</i>
	rs1059384	0,277	3'UTR
SLC22A7	rs17209379	0,107	<i>Upstream</i>
	rs1574430	0,397	<i>Downstream</i>
	rs2270860	0,275	<i>Synonymous coding</i>
	rs4149178	0,129	3'UTR
TYMP	rs470119	0,402	<i>Downstream</i>
TYMS	rs2853741	0,297	<i>Upstream</i>
TYMS/ENOSF1	rs699517	0,280	3'UTR
UMPS	rs2279199	0,491	5'UTR
	rs1139538	0,388	5'UTR
	rs4678145	0,117	<i>Upstream</i>
	rs9844948	0,150	<i>Upstream</i>
	rs3772804	0,339	<i>Upstream</i>

SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; MAF, Frecuencia del alelo minoritario; UTR, del inglés, *Untranslated Region*.

3.6.- Genotipado de tag-SNPs

De los 26 tag-SNPs seleccionados (Tabla 4), fueron genotipados 23 en el Centro Nacional de Genotipado- Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos – Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCIII) a través de la tecnología de genotipado *OpenArray*®

(*Applied Biosystems*) con sondas TaqMan™ según instrucciones del fabricante²¹⁸. Los SNPs *CES1* rs2397787, *DPYD* rs1042482 y *ENOSF1* rs1059384 fueron descartados debido a problemas con el diseño y síntesis de la sonda TaqMan™.

3.7.- Secuenciación de exomas

Se seleccionó una muestra de 8 sujetos de la población de 319 pacientes (en adelante población global) con elevado grado de toxicidad inducida por capecitabina para secuenciar su exoma completo. La elaboración de las librerías se realizó en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón y la secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Las librerías fueron preparadas utilizando el kit *ION Ampliseq™ Exome RDY v3* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) mediante sucesivos pasos de amplificación de exones, digestión, purificación, ecualización y purificación magnética de acuerdo a las recomendaciones del fabricante²¹⁹.

Se utilizaron 100 ng de ADN de partida para la amplificación de los exomas. Las condiciones de la amplificación y de la posterior PCR realizada pueden consultarse en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5. Condiciones de la amplificación exónica.

Componente	Volumen (μL)
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	14
100 ng gADN	6
Agua libre de nucleasa	50
Total	70

ADN, ácido desoxirribonucleótido

Tabla 6. Condiciones de la PCR utilizada para la amplificación exónica.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación enzimática	99	2 min
Desnaturalización	99	15 s
Anillamiento/Extensión	60	16 min
--	10	Mantenimiento

Tras la amplificación de los exones, se llevó a cabo la digestión parcial de los fragmentos amplificados utilizando 6µl de *FuPa Reagent* y realizando una PCR posteriormente con las condiciones indicadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de la PCR utilizada para la digestión parcial.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Activación enzimática	99	2 min
Desnaturalización	99	15 s
Anillamiento/Extensión	60	16 min
--	10	Mantenimiento

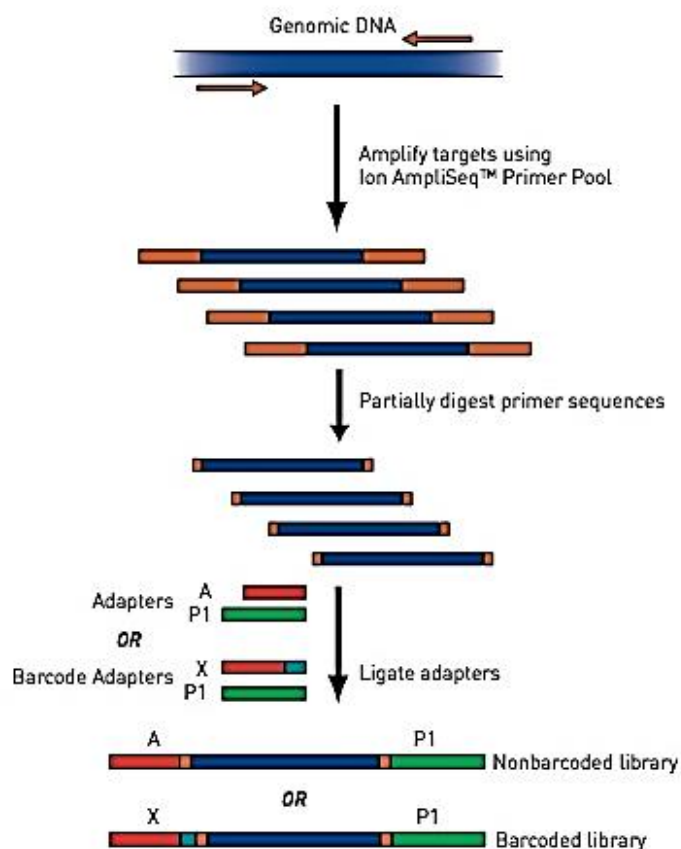
Los adaptadores o identificadores, utilizados para revelar la secuencia genómica de cada paciente, fueron ligados a estos fragmentos mediante las soluciones *Ion Adapter*, *Ion Xpress Barcode X* y ADN ligasa y posterior PCR (Tabla 8).

Tabla 8. Condiciones de la PCR utilizada para ligar los adaptadores a los fragmentos.

Temperatura (°C)	Tiempo
22	30 min
72	10 min
10	Mantenimiento (1 h)

El proceso descrito se esquematiza en la Figura 10.

Figura 10. Preparación de las librerías mediante amplificación, digestión parcial de los fragmentos amplificados y ligamiento de adaptadores.



Posteriormente se procedió a la purificación de las librerías utilizando el reactivo *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) según instrucciones del fabricante²¹⁹. Las librerías fueron cuantificadas mediante un fluorímetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo al protocolo y ecualizadas utilizando el kit *Ion Library Equalizer* (Applied Biosystems) hasta una concentración final de 100pM. La ecualización se realizó a través del reactivo *AMPure XP Beads* y posterior PCR (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de la PCR utilizada para la ecualización de las librerías.

Temperatura (°C)	Tiempo
98	2 min
98	15 s
64	1 min
10	Mantenimiento (1 h)

Las librerías fueron combinadas en pares, acopladas a esferas para la secuenciación y amplificadas por PCR en una emulsión utilizando el kit *Ion PI™ Template OT2 200 v3* y los equipos *OneTouch2* y *OneTouch ES* (*Applied Biosystems*). Las muestras se cargaron en el *Ion PI chip v2* y se corrieron en un secuenciador *Ion Proton* (*Applied Biosystems*).

3.8.- Identificación de variantes en los exomas secuenciados

Las secuencias fueron alineadas y las variantes identificadas mediante comparación con la secuencia de referencia genómica humana hg19 (*University California Santa Cruz, UCSC*) equivalente a la *Genome Reference Consortium* h37 (GRCh37). Dichas variantes fueron detectadas mediante el software *Ion Reporter™* (*Applied Biosystems*) y la configuración para muestras individuales. Los datos fueron exportados a archivos VCF. Posteriormente, para facilitar el manejo de los mismos, se utilizó Microsoft Excel®.

Las variantes obtenidas fueron filtradas para los 33 genes conocidos de la ruta de las fluoropirimidinas, implicados en el transporte, metabolismo y mecanismo de acción de la capecitabina: *ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCG2, CDA, CES1, CES2, CYP2A6, DHFR, DPYD, DPYS, ERCC2, FPGS, GGH, MTHFR, PPAT, RRM1, RRM2, SLC22A7, SLC29A1, SMUG1, TDG, TK1, TP53, TYMP, TYMS, UCK1, UCK2, UMPS, UPB1, UPP1, UPP2* y *XRCC3*.

Esto permitió la identificación de todas las variantes en genes de la ruta de las fluoropirimidinas en los 8 pacientes con respecto a la secuencia de referencia y la posterior selección, entre éstas, de las variantes no sinónimas y *frameshift* en SNPs e inserciones/deleciones localizadas en regiones exónicas codificantes, las cuales fueron verificadas posteriormente.

3.8.1.- Verificación de las variantes obtenidas en regiones codificantes

Las variantes obtenidas en regiones exónicas codificantes de los 8 pacientes se verificaron mediante secuenciación de Sanger, SNaPshot, LightSNiPs o genotipado mediante PCR a tiempo real con sondas TaqMan™, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, tal y como se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Técnicas y secuencias de oligonucleótidos empleadas para la verificación de las variantes obtenidas en regiones codificantes.

Gen	SNP	Método de verificación	Oligo-nucleótido	Secuencia
ABCC4	rs11568658	Secuenciación	F	GGTGTTTAATGCAATGAAAAAGGATCCC
			R	TTGACATCACACGAGACTTCCTC
ABCG2	rs2231137	Secuenciación	F	CCTGTGAGGTTCAGTGTAGGTA
			R	GGGATGTATTTGACATCTAATTGGAGT
	rs2231142	Secuenciación	F	ACAGGAACTTCTGAATCAGAGTCAT
			R	GTTTGGAATGTCTGCTGGTAGTTA
CDA	rs2072671	SNaPshot	F	CTGAAGCCTGAGTGTGTCCA
			R	CCATCCAACCTCCTCCTCA
			SNAP	TTTTCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGC TGGTTTGCTCCAAGGAGGCCAAG
DPYD	rs1801158	LightSNiPs	F	F-TTTGCAGTCACAATATGGAGCT
			A	A-ATGTGCTGGTGGCTGGAGT
			FL	GCCATTTCTACACTAATGTCC--FL
			LC	LC-CCAGATCAATAGGAGTGTA GAGGGG-PH
	rs1801159	LightSNiPs	F	F-GTTTCTGCCAAGCCTGAAC
			R	R-TCCAGCTTCAAAAGCTCTTCG
			FL	CCAAAAGGATTACAACTCA--FL
			LC	LC-CCGGCCATTCTACACTAATGTCCACC- PH
	rs1801265	LightSNiPs	F	F-TGAGAGAGACCGTGTCTCAA
			R	R-CAGCATGAAATAGTGATCAGTGGTA
			FL	GCTTTAAATCCTCGAACACAACTCA--FL
			LC	LC-CAACTCTGCGTTCCAATTCTG-PH
	rs1801160	TaqMan™	F	F-GCATGAAAATGTTGATGTG
			R	R-CAGACACTCCTCCATATG
			Alelo G	TGCCAATGGCGTTACAGCCA-FAM
			Alelo A	TGCCAATGGCATTACAGCCA-VIC
	rs2297595	SNaPshot	F	CAATCGAGCCAAAAAGGAAG
			R	CCCTCTAGGTGGGAGTAGGG
			SNAP	AAATTTTAACCATGACAATTGATTCCCCG TAGGTATTCAAAGCA
	Nueva	Secuenciación	F	TTTGTCTGCACGTCTCCAG
			R	GGGATCATAAAGGGCACAAA
FPGS	rs10760502	Secuenciación	F	GCGGTGCTGATTGATGGCG
			R	GGGACGCTATAGTCTCCGAATTCC
GGH	rs11545077	Secuenciación	F	GGTTCCTCCTGCACCAAAAGC
			R	CGTTTCAGAGTCTCCGCTTAGG
MTHFR	rs1801133	SNaPshot	F	TCACAAAGCGGAAGAATG
			R	GCCTCTCCTGACTGTCATC

Gen	SNP	Método de verificación	Oligo-nucleótido	Secuencia
	rs2274976	Secuenciación	SNAP	AGAATGTGTCAGCCTCAAAGAA AAGCTGCGTGATGATGAAATCG
			F	TTTACAGGGAAGTGTGTTTATGTCAGG
	rs35737219	Secuenciación	R	CATTTGTTGAGCTCAGCTTGAAGTAG
			F	AAGCAGCACTGTGGAGGAGGAA
	rs4135113	Secuenciación	R	ACACTGGACCCAGCCTTCAGG
			F	TTTACAGGGAAGTGTGTTTATGTCAGG
TDG	rs4135113	Secuenciación	R	CATTTGTTGAGCTCAGCTTGAAGTAG
UPP2	rs6710480	Secuenciación	F	TAGGATGCCACACCTTCAAAGGG
			R	CCACTGTTTTTATTGCTTTATGAGCTG
XRCC3	rs861539	Secuenciación	F	CCAGAACCTGAGAAACAGGAAGCA
			R	CTGGTGGTCATCGACTCGGT
UCK1	Nueva	Secuenciación	F	CCGCTACCCCTATCAGGAA
			R	GATCGCTCCAGTCGCCTC
GGH	Nueva	Secuenciación	F	GCAGAGCTTTTGAAGGCGG
			R	GCACCAAAAGCGAAGCACAT

SNP, del inglés, *single nucleotide Polymorphism*; F, oligonucleótido *forward*; R, oligonucleótido *reverse*; FL, fluoresceína; LC, *LC-Red Dye*; PH, fosfato; SNAP, sonda para SNaPshot.

3.8.1.1.- Secuenciación de Sanger

El genotipo de los polimorfismos rs11568658 (*ABCC4*), rs2231137, rs2231142 (*ABCG2*), rs10760502 (*FPGS*), rs11545077 (*GGH*), rs2274976, rs35737219 (*MTHFR*), rs4135113 (*TDG*), rs6710480 (*UPP2*) y rs861539 (*XRCC3*), así como de los 3 nuevos hallados en *DPYD*, *UCK1* y *GGH*, fue realizado en los pacientes cuyo exoma fue descifrado mediante mediante una segunda técnica, en este caso PCR y secuenciación de Sanger.

Los oligonucleótidos utilizados F y R para cada una de las amplificaciones y su secuencia se detallan en la Tabla 10. Las condiciones de la PCR del producto de amplificación se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de la PCR utilizada en la secuenciación de Sanger.

Componente	Volumen (μL)	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
2X PCR Master Mix (Promega)	12,5	Activación	95	5 min
Oligonucleótido F (10μM)	2	Desnaturalización	94	30 s
Oligonucleótido R (10μM)	2	Anillamiento	57	40 s
Agua	7,5	Extensión	72	90 s
ADN genómico (10ng/μL)	1	Extensión final	72	5 min
Volumen total	25	Mantenimiento	4	

ADN, ácido desoxirribonucleótido; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Los productos de PCR fueron purificados mediante *Illustra ExoSapIt* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones de la Tabla 12. La secuenciación fue realizada en la Unidad de Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón y la secuencia fue analizada con *SnapGene Viewer 3.2.1* (GSL Biotech, Chicago, IL, USA).

Tabla 12. Condiciones de purificación por *ExoSapIt*.

Componente	Volumen (μL)	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Producto de PCR	5	Incubación	37	1 h
<i>ExoSapIt</i>	1	Inactivación	80	15 min
Volumen total	6			

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

3.8.1.2.- SNaPshot

Los polimorfismos rs2072671 (*CDA*), rs2297595 (*DPYD*) y rs1801133 (*MTHFR*) fueron genotipados en los pacientes cuyo exoma fue secuenciado mediante una segunda técnica, en este caso SNaPshot.

Esta técnica permite el genotipado de hasta 15 SNPs en una única reacción y, básicamente, tiene 3 pasos. En el primero de ellos se lleva a cabo una reacción múltiple

de PCR mediante la cual el ADN de los pacientes es amplificado en un termociclador (Tabla 13).

Tabla 13. Condiciones de la PCR inicial de la técnica SNaPshot.

Componente	Volumen (μ L)	Proceso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	10	Activación	95	15 min
Mezcla de oligonucleótidos	4	Desnaturalización	94	30 s
Agua	4	Anillamiento	60	90 s
ADN genómico	2	Extensión	72	90 s
Volumen total	20	Extensión final	72	5 min
		Mantenimiento	4	

ADN, ácido desoxirribonucleótido; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

En esta reacción se combinan todos los oligonucleótidos F y R (Tabla 10) para dar lugar a productos de amplificación de tamaños diferentes. Después de comprobar la correcta amplificación por electroforesis con el *BioAnalyzer 2100* y el *kit DNA1000 (Agilent Technologies)*, el producto de PCR es purificado mediante *ExoSapIt (GE Healthcare)*, con el fin de digerir los nucleótidos no incorporados y los oligonucleótidos sobrantes para que éstos no interfieran en la reacción de SNaPshot (Tabla 12).

En el segundo paso, una vez obtenidos los productos de PCR que contienen los SNPs para genotipar, se realiza la reacción de SNaPshot mediante el *SNaPshot Multiplex Kit (Life Technologies)*, según las recomendaciones del fabricante²²⁰. En ella se produce la extensión de un oligonucleótido diseñado adyacente al SNP de interés por uno de los 4 dideoxinucleótidos trifosfato marcados mediante fluorescencia. Estos oligonucleótidos, puesto que intervienen en una reacción múltiple, son diseñados con un tamaño diferente para poder ser diferenciados más adelante en la electroforesis capilar (Tabla 10). Los nucleótidos que se utilizan en esta reacción tienen una modificación estructural que impide a la Taq ADN polimerasa seguir añadiendo más nucleótidos, y además están

marcados con un fluorocromo distinto que permitirá diferenciarlos más adelante. Una vez finalizada la reacción de SNaPshot, la mezcla se trata con fosfatasa alcalina para eliminar los nucleótidos fluorescentes no incorporados (Tabla 14).

Tabla 14. Condiciones de la reacción de SNaPshot.

Componente	Volumen (μL)	Temperatura (°C)	Tiempo
Mix SNaPshot	2,5	96	10 s
Producto de PCR	1,5	50	5 s
Mezcla de oligonucleótidos	0,5	60	30 s
Agua	0,5	4	Pausa
Volumen total	5	Adición de 0,5 μL de fosfatasa alcalina	
		37	1 h
		75	15 min
		4	

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Los productos extendidos tras la reacción de SNaPshot son finalmente separados en el tercer paso mediante un secuenciador capilar *ABI Prism 3100 (Life Technologies)* y los SNPs son discriminados utilizando el software *PeakScan* versión 1.0 (*Life Technologies*).

3.8.1.3.- LightSNiPs

Los polimorfismos rs1801158, rs1801159 y rs1801265 en *DPYD* fueron genotipados en los pacientes cuyo exoma fue secuenciado mediante una segunda técnica, en este caso utilizando sondas LightSNiPs (*TIB MOLBIOL, Berlin, Germany*) en un *LighCycler® 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)*. Las sondas LightSNiPs consisten en un par de oligonucleótidos que amplifican la región de interés y otro par de oligonucleótidos modificados con moléculas fluorescentes que se transfieren energía si están muy próximas, tecnología conocida como FRET (del inglés, *Fluoresce Resonance Energy Transfer*). Si las dos sondas marcadas encuentran un ADN al que unirse se aproximan y emiten fluorescencia que es detectada. Una de las sondas está marcada con fluoresceína

(FL) en su extremo 3' y la otra está marcada con LC-Red DY (LC). Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo los siguientes protocolos de mezcla de reacción y de PCR (Tabla 15).

Tabla 15. Condiciones de la reacción de LightSNiPs.

Componente	Volumen (μ L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Número de ciclos
<i>LightCycler</i> ® 480 <i>Genotyping</i> Master	1	37	30 s	1
Oligonucleótidos no marcados (10 μ M)	0,25 de cada	95	20 s	1
Oligonucleótidos marcados (3 μ M)	0,25 de cada	95	3 s	40
ADN (10ng/ μ l)	2	60	20 s	
Agua	1	37	30 s	1
Volumen total	5			

ADN, ácido desoxirribonucleótido.

El análisis de los genotipos se realizó utilizando el *LightCycler*® 480 software v1.5 (*Roche Diagnostics*).

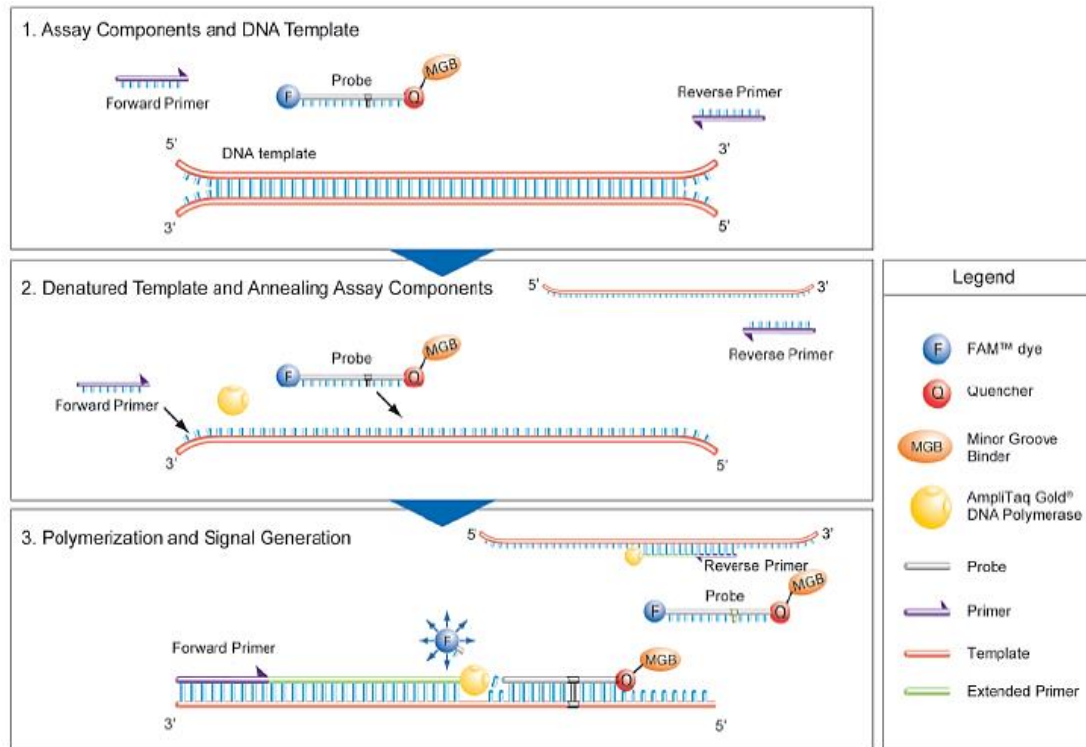
3.8.1.4.- PCR a tiempo real con sondas TaqMan™

El polimorfismo rs1801160 (*DPYD*) fue genotipado en los pacientes cuyo exoma fue secuenciado mediante una segunda técnica, en este caso PCR a tiempo real con sondas TaqMan™. Se sintetizaron sondas *TaqMan*® *SNP genotyping Assay* para este polimorfismo. El procedimiento se encuentra detallado en la Tabla 11 y esquematizado en la Figura 11²²¹.

Cada una de estas sondas TaqMan™ está compuesta por 4 oligonucleótidos: 2 que flanquean la secuencia a analizar (F y R) y 2 internos que contienen el SNP que se interrogará con las 2 posibles secuencias, cada uno de estos últimos marcado con un fluoróforo diferente (VIC y 6-FAM). Estos 2 oligonucleótidos marcados con moléculas fluorescentes portan además un *quencher* que absorbe y enmascara la fluorescencia de VIC y 6-FAM por proximidad. Durante la PCR, los oligonucleótidos marcados reconocen

la secuencia homóloga y se unen sólo si la secuencia es totalmente complementaria. Durante el paso de extensión de la Taq ADN polimerasa ésta llega al oligonucleótido marcado, liberando el *quencher* y permitiendo la emisión del fluoróforo correspondiente a la secuencia homóloga.

Figura 11. Procedimiento de genotipado mediante sondas TaqMan™. *Life Technologies Corporation*.



En el caso de que el paciente sea heterocigoto para el SNP en cuestión, se observarán los dos tipos de fluorescencia. Si el paciente es, por el contrario, homocigoto se observará únicamente una de las dos florescencias, indicándonos si es homocigoto salvaje o mutado. Las sondas fueron diseñadas y sintetizadas por *Life Technologies*. La reacción de PCR a tiempo real fue desarrollada en el equipo *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*) usando *TaqMan® GTXpress Master Mix* (*Applied Biosystems*), la sonda TaqMan™ correspondiente y el ADN de los pacientes, según instrucciones del fabricante²¹⁸. Los resultados fueron analizados utilizando el software *StepOne v2.3*.

3.8.2.- Predicción del efecto de las variantes *in silico*

SIFT (del inglés, *Sorting Intolerant From Tolerant*²²²) y PolyPhen-2 (del inglés, *Polymorphism Phenotyping*²²³) son herramientas que predicen el posible impacto de las sustituciones aminoacídicas en la estructura y función de las proteínas humanas. Se registraron las puntuaciones SIFT y PolyPhen-2 para todas las variaciones no sinónimas y *frameshift* en regiones exónicas codificantes identificadas en los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado.

PolyPhen-2 utiliza consideraciones físicas y comparativas directas y genera, para cada variante, un resultado de predicción cualitativa (benigna, posiblemente dañina o probablemente dañina) y una puntuación de probabilidad numérica, además de los datos de sensibilidad y especificidad. Los resultados “probablemente dañina” y “posiblemente dañina” significan que la variante se prevé que sea dañina con alta y baja confianza, respectivamente, mientras que una predicción “benigna” significa que la variante se predice como benigna con alta confianza. Las puntuaciones de probabilidad numéricas oscilan de 0 (benigna) a 1 (dañina)²²⁴.

SIFT se basa en el grado de conservación de los residuos aminoacídicos dentro de las familias de proteínas. Las posiciones altamente conservadas tienden a ser intolerantes a la sustitución, mientras que aquellas con un bajo grado de conservación toleran la mayoría de las sustituciones. De esta manera predice las sustituciones que afectan a la funcionalidad de las proteínas si la probabilidad escalada, también denominada puntuación SIFT, se encuentra por debajo de un cierto valor umbral. El rango de puntuación SIFT oscila de 0 a 1. La sustitución aminoacídica se predice como dañina si la puntuación es $\leq 0,05$ y tolerada si la puntuación es $> 0,05$ ²²⁵.

3.9.- Genotipado de polimorfismos en la población global de estudio

Los SNPs clasificados como dañinos o probablemente dañinos por SIFT y PolyPhen-2, respectivamente, fueron seleccionados para su genotipado en la población de 319 pacientes tratados con capecitabina con el fin de estudiar la posible asociación con toxicidad severa (Tabla 16).

Para este estudio, los polimorfismos rs11568658 (*ABCC4*) y rs1801160 (*DPYD*) fueron genotipados mediante PCR a tiempo real con sondas TaqMan™ (C__31356445_10 y C__11372171_10, respectivamente). La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). Los resultados fueron analizados utilizando el software *StepOne v2.3*.

El polimorfismo rs1801158 (*DPYD*) fue genotipado mediante el uso de una sonda LightSNiPs (*TIB MOLBIOL, Berlin, Germany*) en un *LightCycler 480-II* (*Roche Diagnostics, Basel, Switzerland*) (Tabla 10).

Los polimorfismos rs2297595 (*DPYD*) y rs1801133 (*MTHFR*) fueron analizados mediante SNaPshot (Tabla 10).

Las técnicas de genotipado se encuentran descritas en detalle en el apartado 3.8.1.

Tabla 16. Polimorfismos genotipados en la población global y técnicas de genotipado empleadas.

Gen	SNP	Técnica de genotipado
<i>ABCC4</i>	rs11568658	PCR a tiempo real con sondas TaqMan™
<i>DPYD</i>	rs1801158	Sondas LightSNiPs
	rs1801160	PCR a tiempo real con sondas TaqMan™
	rs2297595	SNaPshot
<i>MTHFR</i>	rs1801133	SNaPshot

SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

3.10.- Análisis estadístico

Los datos se registraron en una base de datos de Microsoft Access® y fueron exportados a la aplicación Microsoft Excel® para facilitar su manejo. Posteriormente se analizaron utilizando el programa *Statistical Package for the Social Sciences* versión 15 (SPSS, Inc).

Para el estudio de las reacciones adversas severas se tuvieron en cuenta las toxicidades como variables binarias de acuerdo a la clasificación NCI CTCAE v4.0 (nula/moderada: grado 0-2 frente a severa: grado 3-5).

Se estudió mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal la asociación entre los 23 tag-SNPs y cada una de las reacciones adversas severas a capecitabina, así como toxicidad global, reducción, retraso de dosis o retirada de capecitabina por toxicidad (análisis univariante). El análisis se realizó bajo un modelo codominante o aditivo. Para aquellas asociaciones estadísticamente significativas, se determinó la magnitud de la asociación mediante *odds ratios* (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95% mediante modelos de regresión logística multivariante dominantes y recesivos. Se analizaron variables de confusión como sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia, PS y medicación concomitante. Los valores de p estadísticamente significativos fueron ajustados mediante Benjamini y Hochberg *False Discovery Rate* (FDR) utilizando el software R versión 3.3.3 para minimizar la limitación de la multitud de ensayos realizados simultáneamente. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Igualmente, se estudió la asociación bajo un modelo codominante entre los SNPs seleccionados en la secuenciación de exomas y la toxicidad global a capecitabina, así como la reducción, retraso de dosis y retirada de capecitabina por toxicidad mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal (análisis univariante). No se realizó ninguna corrección para las pruebas múltiples debido a la naturaleza exploratoria de este estudio. Se determinó la magnitud de la asociación mediante OR con sus correspondientes IC al 95% mediante modelos de regresión logística multivariante para las asociaciones que habían sido estadísticamente significativas en el análisis previo univariante. Se utilizaron los modelos dominante y recesivo para el análisis multivariante. Se analizaron variables de confusión como sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia y medicación concomitante. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Dada la importancia de las variantes de *DPYD* en el metabolismo de 5-FU y que aparecieron 5 de ellas en los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado, se llevó a cabo un estudio sobre el posible efecto acumulativo de estas variantes en la toxicidad. Para ello se creó una puntuación midiendo el número de estas variantes por paciente. Para aquellos pacientes que presentaban el alelo salvaje en homocigosis se asignó una puntuación de 0, para los heterocigotos se asignó una puntuación de 1 y para aquellos

que presentaban en homocigosis el alelo mutado, la puntuación asignada fue 2. Posteriormente se obtuvo un valor por paciente sumando la puntuación de las 5 variantes analizadas. Este análisis fue realizado en la población de 319 pacientes. Para el análisis estadístico mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal se crearon 2 grupos: pacientes con 0-3 puntos y pacientes con 4-10 puntos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en genes candidatos mediante selección de tag-SNPs

4.1.1.- Características basales de los pacientes

En el presente estudio fueron incluidos 301 pacientes diagnosticados de CCR tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina, procedentes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Ramón y Cajal.

4.1.1.1.- Análisis de datos de pacientes y de tratamiento recibido

La mediana de edad al diagnóstico fue 65 años (rango, 30-88 años) y la distribución por sexos fue prácticamente homogénea (51,8% hombres y 48,2% mujeres). Los pacientes presentaron mayoritariamente cáncer de colon (72,4%) frente a cáncer de recto, siendo el estadio tumoral avanzado (grado IV) el más frecuente (40,9%). La mayoría de los pacientes procedieron de 2 de los hospitales participantes en el estudio, el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (40,9%) y el Hospital Universitario 12 de Octubre (51,1%).

La combinación de regímenes como abordaje terapéutico fue más frecuente que la capecitabina en monoterapia (79,1% vs 20,9%), como era de esperar según las prácticas habituales de los hospitales participantes. En más de la mitad de las líneas de tratamiento, el oxaliplatino fue el fármaco elegido como complemento a la fluoropirimidina (66,4%). Otros fármacos administrados de forma concomitante, pero en menor medida, fueron irinotecan y anticuerpos monoclonales (bevacizumab, cetuximab y panitumumab).

Un 18,3% de los tratamientos recibidos se interrumpió definitivamente debido a la elevada toxicidad. Asimismo, fueron comunes los retrasos en la administración de sucesivos ciclos de quimioterapia y las reducciones de dosis que, junto con las suspensiones del tratamiento por toxicidad, se pusieron de manifiesto en un 74,1% de los pacientes. Los datos demográficos y de tratamiento se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Características basales y de tratamiento.

Parámetro	N (%)
Edad (años)	
Mediana de edad al diagnóstico	65 (30-88)
Sexo	
Hombres	156 (51,8%)
Mujeres	145 (48,2%)
Tipo de cáncer	
Colon	218 (72,4%)
Recto	83 (27,6%)
Estadio tumoral	
I-II	60 (19,9%)
III	118 (39,2%)
IV	123 (40,9%)
Hospital	
Hospital General Universitario Gregorio Marañón	123 (40,9%)
Hospital Universitario La Paz	19 (6,3%)
Hospital Universitario 12 de Octubre	154 (51,1%)
Hospital Universitario Ramón y Cajal	5 (1,7%)
Línea de tratamiento	
Adyuvante	140 (46,5%)
Metastásico	157 (52,2%)
Neoadyuvante	4 (1,3%)
Tipo de régimen	
Monoterapia	63 (20,9%)
Combinación	238 (79,1%)
Fármacos concomitantes	
Oxaliplatino	200 (66,4%)
Irinotecan	39 (13,0%)
Anticuerpos monoclonales	77 (25,6%)
Motivo de fin de tratamiento	
Petición del paciente	6 (2,0%)
Toxicidad inaceptable	55 (18,3%)
Progresión	73 (24,3%)
Fin de tratamiento	141 (46,8%)
Criterio médico	14 (4,6%)
Exitus	5 (1,7%)
Cirugía de rescate	7 (2,3%)
Reducción o retraso de dosis y retirada del fármaco por toxicidad	223 (74,1%)

4.1.1.2.- Análisis de reacciones adversas severas

Las reacciones adversas severas observadas con mayor frecuencia en los pacientes tratados con quimioterapia basada en capecitabina fueron diarrea (12,6%), toxicidad hematológica (10,6%) y síndrome mano-pie (8,0%). Las frecuencias detalladas de las mismas pueden observarse en la Tabla 18.

Tabla 18. Reacciones adversas severas.

Reacciones adversas grado>2*	N (%)
Diarrea	38 (12,6%)
Toxicidad hematológica	32 (10,6%)
Síndrome mano-pie	24 (8,0%)
Reacción alérgica	16 (5,3%)
Astenia	16 (5,3%)
Hipertransaminemia	11 (3,7%)
Nauseas/vómitos	10 (3,3%)
Hiperbilirrubinemia	10 (3,3%)
Mucositis/estomatitis	5 (1,7%)
Pérdida de peso y anorexia	4 (1,3%)
Toxicidad cutánea	4 (1,3%)

*Reacciones adversas revisadas de acuerdo a la clasificación CTCAE v4.0 del NCI.

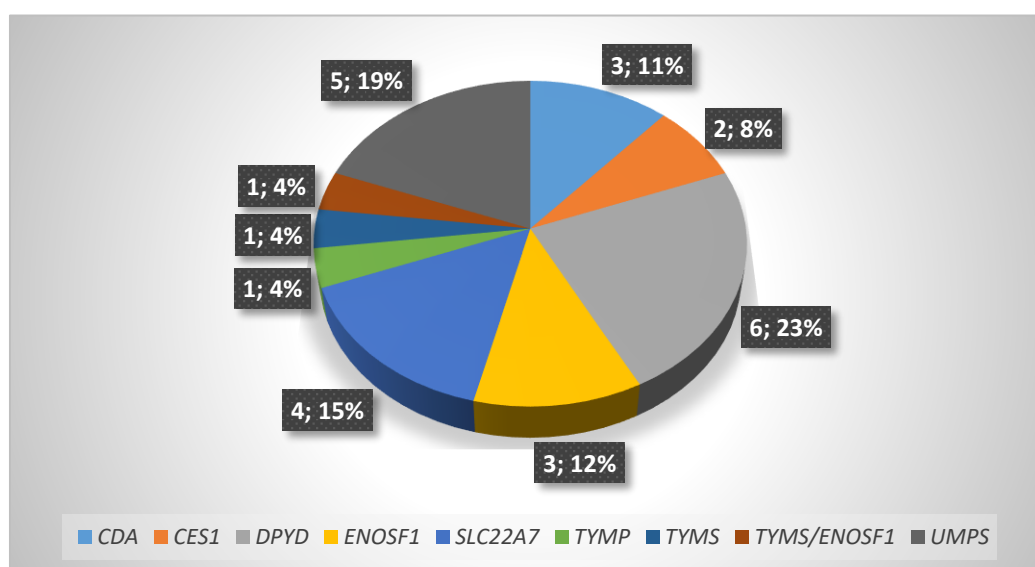
La prescripción de factores estimulantes de colonias granulocíticas (GCSF) debido a neutropenia fue necesaria en 15 pacientes (5,0%). Un total de 133 pacientes sufrieron algún tipo de reacción adversa severa (44,2%).

4.1.2.- Tag-SNPs seleccionados en la ruta de las fluoropirimidinas y genotipado

Los genes analizados en el presente estudio fueron *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* y *UMPS*. De acuerdo a los criterios aplicados (ver sección 3.5 de Material y Métodos), se seleccionaron 26 tag-SNPs en dichos genes utilizando la herramienta web SYSNPs (Tabla 4).

La distribución del número y frecuencia de SNPs seleccionados por gen se muestra en la Figura 12.

Figura 12. Proporción de tag-SNPs seleccionados en cada gen analizado.



Número de tag-SNPs identificados; porcentaje de tag-SNPs.

La localización de estos tag-SNPs seleccionados fue proporcionada por la misma herramienta web SYSNPs y posteriormente revisada empleando la base de datos de dbSNPs²²⁶. De los SNPs seleccionados, 2 de ellos eran variantes no sinónimas en regiones codificantes (*CDA* rs2072671, *ENOSF1* rs2612086), 6 se encontraban en regiones 3'UTR (*DPYD* rs291593, *DPYD* rs291592, *DPYD* rs1042482, *ENOSF1* rs1059384, *SLC22A7* rs4149178 y *TYMS/ENOSF1* rs699517) y 3 en regiones 5'UTR (*CDA* rs12726436, *UMPS* rs2279199, *UMPS* rs1139538). El resto de SNPs se encontraban localizados en regiones *upstream/downstream* y en regiones codificantes, pero estas últimas eran variantes sinónimas. La frecuencia del alelo minoritario (MAF) fue mayor de 0,05 para todos los SNPs, atendiendo a los criterios de selección.

De los 26 tag-SNPs seleccionados, fueron genotipados 23 en el CeGen-PRB2-ISCI. Los SNPs *CES1* rs2397787, *DPYD* rs1042482 y *ENOSF1* rs1059384 fueron descartados debido a problemas con el diseño y la síntesis de la sonda TaqManTM. La tasa de éxito de genotipado fue 95,2% con una concordancia de 100% entre muestras duplicadas que se utilizaron como control de calidad.

4.1.3.- Análisis de la asociación de tag-SNPs y reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina

Los siguientes 23 SNPs fueron analizados para estudiar su asociación con reacciones adversas severas en los 301 pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina: rs12726436, rs2072671 y rs1048977 en *CDA*, rs7498748 en *CES1*, rs291593, rs291592, rs12119882, rs6668296 y rs4421623 en *DPYD*, rs3744962 y rs2612086 en *ENOSF1*, rs17209379, rs1574430, rs2270860 y rs4149178 en *SLC22A7*, rs470119 en *TYMP*, rs2853741 en *TYMS*, rs699517 común a *TYMS* y *ENOSF1* y rs2279199, rs1139538, rs4678145, rs9844948 y rs3772804 en *UMPS*.

Se hizo un primer análisis univariante según un modelo codominante o aditivo y posteriormente, con las asociaciones estadísticamente significativas del primer análisis, uno multivariante según modelos dominante y recesivo. En la Tabla 19 se muestran los valores de p obtenidos en el análisis univariante mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal. Se obtuvieron 21 asociaciones estadísticamente significativas de SNPs con efectos adversos severos: *CDA* rs12726436 con retraso de dosis ($p=0,025$), *CDA* rs2072671 con síndrome mano-pie ($p=0,028$) y toxicidad global ($p=0,011$), *CDA* rs1048977 con hiperbilirrubinemia ($p=0,029$), *DPYD* rs12119882 con hiperbilirrubinemia ($p=0,018$), *ENOSF1* rs3744962 con reacción alérgica ($p<0,001$), *ENOSF1* rs2612086 con hiperbilirrubinemia ($p=0,031$), *SLC22A7* rs17209379 con síndrome mano-pie ($p=0,017$), reacción alérgica ($p=0,008$) y retirada de tratamiento ($p=0,048$), *SLC22A7* rs2270860 con toxicidad cutánea ($p=0,008$), *SLC22A7* rs4149178 con diarrea ($p=0,026$), *TYMS* rs2853741 con náuseas/vómitos ($p=0,006$) y diarrea ($p=0,048$), *TYMS/ENOSF1* rs699517 con náuseas/vómitos ($p=0,027$), pérdida de peso/anorexia ($p=0,009$) y astenia ($p=0,021$), *UMPS* rs2279199 con náuseas/vómitos ($p=0,008$), *UMPS* rs1139538 con náuseas/vómitos ($p=0,045$) y pérdida de peso/anorexia ($p=0,033$) y *UMPS* rs4678145 con astenia ($p=0,002$).

En las tablas de contingencia de estas asociaciones estadísticamente significativas se pueden observar los porcentajes de pacientes para cada genotipo que presentaron toxicidad severa (Tabla 20).

Tabla 19. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. Se resaltan en rojo aquéllos valores de p estadísticamente significativos (p<0,05).

	CDA			CES1	DPYD					ENOSF1	
	rs12726436	rs2072671	rs1048977	rs7498748	rs291593	rs291592	rs12119882	rs6668296	rs4421623	rs3744962	rs2612086
Náuseas /vómitos	0,639	0,333	0,606	0,605	0,399	0,803	1,000	0,403	0,423	0,707	0,803
Diarrea	0,256	0,135	0,791	1,000	0,392	0,794	1,000	1,000	0,308	0,386	1,000
Mucositis/estomatitis	0,629	1,000	0,732	1,000	1,000	1,000	0,626	0,614	1,000	1,000	1,000
Hiperbilirrubinemia	1,000	0,367	0,029	1,000	0,104	0,654	0,018	0,425	1,000	0,705	0,031
Hipertransaminemia	0,391	0,229	0,068	0,605	0,285	0,803	0,380	0,720	1,000	1,000	1,000
Pérdida de peso/anorexia	1,000	0,727	0,729	1,000	1,000	0,497	0,657	0,169	0,721	0,607	0,706
Toxicidad cutánea	0,654	0,727	1,000	0,358	0,087	0,693	0,657	0,625	1,000	1,000	1,000
Síndrome mano-pie	0,425	0,028	0,871	1,000	0,600	0,283	0,225	1,000	0,220	0,459	0,260
Toxicidad hematológica	0,809	0,688	0,118	0,553	0,643	0,235	0,256	0,168	0,636	0,821	0,778
Reacción alérgica	1,000	0,359	0,698	1,000	0,830	0,445	0,110	0,581	1,000	<0,001	0,070
Astenia	0,084	0,462	0,169	0,242	0,677	0,366	0,419	0,581	0,055	0,230	0,847
Reducción de dosis	0,876	0,204	0,653	1,000	1,000	0,306	0,486	0,257	0,767	0,776	0,859
Retraso de dosis	0,025	0,546	0,272	0,234	0,620	0,543	0,856	0,249	0,548	0,143	0,318
Retirada de tratamiento	0,738	0,321	0,700	0,213	1,000	0,854	0,343	0,880	1,000	0,164	0,849
Toxicidad global	0,755	0,011	0,243	0,443	0,437	0,670	0,214	0,481	0,166	0,252	0,859

Resultados

	SLC22A7				TYMP	TYMS	TYMS /ENOSF1	UMPS			
	rs17209379	rs1574430	rs2270860	rs4149178				rs2279199	rs1139538	rs4678145	rs9844948
Náuseas /vómitos	0,089	0,086	0,421	0,753	1,000	0,006	0,027	0,008	0,045	0,523	0,467
Diarrea	0,402	0,528	0,161	0,026	0,524	0,048	0,487	0,903	0,703	0,330	1,000
Mucositis/estomatitis	1,000	1,000	1,000	0,717	1,000	0,529	1,000	0,114	1,000	0,061	0,343
Hiperbilirrubinemia	0,705	0,816	0,798	0,341	0,816	0,638	0,794	0,121	0,102	0,767	1,000
Hipertransaminemia	0,402	0,222	0,421	1,000	1,000	0,116	0,183	0,344	0,223	1,000	1,000
Pérdida de peso/anorexia	0,607	0,719	0,234	0,616	0,727	0,254	0,009	0,074	0,033	1,000	1,000
Toxicidad cutánea	0,607	0,065	0,008	1,000	1,000	1,000	1,000	0,164	0,717	0,407	1,000
Síndrome mano-pie	0,017	0,647	0,488	0,680	0,525	0,132	0,058	0,553	0,438	1,000	0,504
Toxicidad hematológica	0,821	0,684	0,454	1,000	0,782	0,379	0,652	0,294	1,000	0,160	0,146
Reacción alérgica	0,008	0,091	1,000	1,000	1,000	0,533	0,837	0,858	0,446	0,629	0,165
Astenia	0,230	0,064	0,155	0,073	1,000	0,076	0,021	0,071	0,575	0,002	0,582
Reducción de dosis	0,482	0,932	0,706	0,300	1,000	1,000	0,850	0,680	0,387	0,078	0,374
Retraso de dosis	0,389	0,662	0,772	0,481	0,929	0,302	0,440	0,557	0,660	0,178	0,604
Retirada de tratamiento	0,048	0,783	0,481	0,388	0,401	0,620	0,920	1,000	0,580	0,483	1,000
Toxicidad global	0,573	0,306	0,573	0,359	0,665	1,000	0,185	0,366	0,491	0,827	0,098
											0,792

Tabla 20. Tablas de contingencia de las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina. Análisis univariante según modelo codominante.

Gen	SNP	Genotipo	n	% Reacción adversa	p	Reacción adversa
CDA	rs12726436	GG	252	34,9	0,025	Retraso de dosis
		AG	40	60		
		AA	2	0		
	rs2072671	AA	125	12,8	0,028	Síndrome mano-pie
		AC	128	3,9		
		CC	41	4,9		
		AA	125	52	0,011	Toxicidad global
		AC	128	39,8		
		CC	41	31,7		
	rs1048977	CC	134	0,7	0,029	Hiperbilirrubinemia
		CT	130	5,4		
		TT	29	6,9		
DPYD	rs12119882	AA	252	2	0,018	Hiperbilirrubinemia
		AG	37	10,8		
ENOSF1	rs3744962	AA	228	2,2	<0,001	Reacción alérgica
		AG	52	15,4		
		GG	2	50		
	rs2612086	GG	36	5,6	0,031	Hiperbilirrubinemia
		AG	146	5,5		
		AA	111	0		
SLC22A7	rs17209379	AA	237	10,1	0,017	Síndrome mano-pie
		AC	54	0		
		CC	2	0		
		AA	237	3,8	0,008	Reacción alérgica
		AC	54	11,1		
		CC	2	50		
		AA	237	29,1	0,048	Retirada de tratamiento
		AC	54	38,9		
		CC	2	100		
	rs2270860	CC	139	0	0,008	Toxicidad cutánea
		CT	132	1,5		
		TT	22	9,1		
	rs4149178	AA	209	15,8	0,026	Diarrea
		AG	77	6,5		
		GG	7	0		
TYMS	rs2853741	TT	26	11,5	0,006	Náuseas /vómitos
		CT	117	4,3		
		CC	136	0,7		

Gen	SNP	Genotipo	n	% Reacción adversa	p	Reacción adversa
		TT	26	7,7	0,048	Diarrea
		CT	117	19,7		
		CC	136	5,9		
TYMS/ENOSF1	rs699517	CC	132	1,5	0,027	Náuseas /vómitos
		CT	138	2,9		
		TT	22	13,6		
		CC	132	0,8	0,009	Pérdida de peso/anorexia
		CT	138	0		
		TT	22	13,6		
		CC	132	9,1	0,021	Astenia
		CT	138	2,9		
		TT	22	0		
UMPS	rs2279199	TT	82	7,3	0,008	Náuseas /vómitos
		CT	144	2,1		
		CC	68	0		
	rs1139538	AA	40	7,5	0,045	Náuseas /vómitos
		AG	137	3,6		
		GG	116	0,9		
		AA	40	5	0,033	Pérdida de peso/anorexia
		AG	137	1,5		
		GG	116	0		
	rs4678145	GG	215	2,8	0,002	Astenia
		CG	67	11,9		
		CC	11	18,2		

SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; n, número de pacientes; p, valor de p.

El análisis mostró que los pacientes que presentaron la variante G en homocigosis para el polimorfismo *CDA* rs12726436 tuvieron menor riesgo de sufrir retrasos de dosis frente aquéllos que presentaban la variante A en heterocigosis. El polimorfismo *CDA* rs2072671 estuvo asociado también de forma estadísticamente significativa al desarrollo de síndrome mano-pie y toxicidad global. En ambos casos los pacientes homocigotos CC para este polimorfismo presentaron una menor probabilidad de padecer síndrome mano-pie y toxicidad global que los homocigotos AA. Por su parte, el polimorfismo *CDA* rs1048977 se asoció significativamente con hiperbilirrubinemia severa, situación en la que la variante T en homocigosis resultó estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollar este efecto adverso de forma severa.

Los portadores de la variante *DPYD* rs12119882 en homocigosis para el alelo A tratados con capecitabina presentaron una menor frecuencia de hiperbilirrubinemia severa que los pacientes heterocigotos para la misma variante.

El polimorfismo rs3744962 del gen *ENOSF1* se asoció significativamente con reacción alérgica, teniendo un mayor riesgo de sufrir dicha reacción los pacientes portadores en homocigosis del alelo G que los portadores de la variante A tanto en heterocigosis como en homocigosis. Por su parte, el alelo G en el polimorfismo *ENOSF1* rs2612086 se asoció a un mayor riesgo de padecer hiperbilirrubinemia severa frente al alelo A.

Respecto al polimorfismo *SLC22A7* rs17209379, éste se asoció estadísticamente a síndrome mano-pie, reacción alérgica y retirada de tratamiento a lo largo de la terapia con capecitabina. Así, los individuos homocigotos para el alelo C tuvieron una mayor frecuencia de reacción alérgica y retirada de tratamiento que los heterocigotos y homocigotos para el alelo A. Sin embargo, fue el alelo A en homocigosis para este mismo polimorfismo el que fue asociado estadísticamente al desarrollo de síndrome mano-pie severo. Por su parte, el polimorfismo rs2270860 en *SLC22A7* se asoció a un mayor riesgo de desarrollar toxicidad cutánea en aquéllos individuos portadores del alelo T en homocigosis respecto a aquéllos individuos portadores del alelo C tanto en heterocigosis como en homocigosis. Un último polimorfismo, rs4149178, en el gen *SLC22A7* fue asociado con diarrea severa, de manera que el alelo G resultó ser un marcador de baja o nula probabilidad de desarrollar el efecto adverso.

La variante C del polimorfismo rs2853741 en el gen *TYMS* resultó protectora frente al desarrollo de náuseas/vómitos y diarrea severas. De esta manera, los individuos homocigotos para el alelo T presentaron mayor probabilidad de desarrollar estas reacciones adversas severas que los individuos homocigotos para el alelo C.

El polimorfismo rs699517 del gen *TYMS* / *ENOSF1* se asoció de forma estadísticamente significativa a náuseas/vómitos, pérdida de peso/anorexia y astenia. Los resultados del análisis muestran cómo los pacientes homocigotos para el alelo T tuvieron mayor probabilidad de sufrir náuseas/vómitos y pérdida de peso/anorexia que los pacientes heterocigotos CT y homocigotos CC. Sin embargo, a la vista de los resultados, el alelo T se mostró protector en el desarrollo de astenia severa.

Tres polimorfismos en *UMPS* fueron asociados estadísticamente al desarrollo de reacciones adversas severas. Ningún paciente homocigoto para la variante C del polimorfismo rs2279199 desarrolló náuseas o vómitos severos frente a los pacientes con los genotipos CT y TT, que los sufrieron en un 2,1 y 7,3% respectivamente. El polimorfismo rs1139538 en *UMPS* se asoció a una mayor frecuencia de desarrollo de náuseas/vómitos y pérdida de peso/anorexia para el alelo A respecto al alelo G tanto en heterocigosis como en homocigosis. Por último, los pacientes con el genotipo CC para el polimorfismo rs4678145 en el gen *UMPS* presentaron mayor riesgo de desarrollar astenia que los pacientes con los genotipos CG y GG.

Para confirmar o desmentir si las asociaciones encontradas eran independientes o dependientes de otro factor se realizó un análisis mediante regresión logística multivariante, según modelos dominante y recesivo, sobre las asociaciones estadísticamente significativas obtenidas en el análisis univariante. Las variables de confusión analizadas fueron sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia, PS y fármacos concomitantes (oxaliplatino, irinotecan o bevacizumab). Además, para limitar el efecto de las combinaciones de factores analizados se realizó una corrección mediante FDR.

Trece de las asociaciones estadísticamente significativas entre tag-SNPs y reacciones adversas severas obtenidas previamente en el análisis univariante, que incluyeron 10 SNPs localizados en 6 genes, se confirmaron al analizar los datos mediante regresión logística multivariante: *CDA* rs12726436 con retraso de dosis ($p=0,005$), *CDA* rs2072671 con síndrome mano-pie ($p=0,008$) y toxicidad global ($p=0,007$), *CDA* rs1048977 con hiperbilirrubinemia ($p=0,044$), *DPYD* rs12119882 con hiperbilirrubinemia ($p=0,031$), *SLC22A7* rs2270860 con toxicidad cutánea ($p=0,016$), *SLC22A7* rs4149178 con diarrea ($p=0,034$), *TYMS* rs2853741 con diarrea ($p=0,008$), *TYMS/ENOSF1* rs699517 con náuseas/vómitos ($p=0,014$), pérdida de peso/anorexia ($p=0,006$) y astenia ($p=0,021$), *UMPS* rs2279199 con náuseas/vómitos ($p=0,036$) y *UMPS* rs4678145 con astenia ($p=0,006$) (Tabla 21).

No se confirmaron las asociaciones estadísticamente significativas obtenidas en el análisis univariante entre los siguientes polimorfismos y reacciones adversas severas: *ENOSF1* rs3744962 y reacción alérgica, *ENOSF1* rs2612086 y desarrollo de hiperbilirrubinemia severa, *SLC22A7* rs17209379 y desarrollo de síndrome mano-pie,

reacción alérgica y retirada de tratamiento, *TYMS* rs2853741 y náuseas/vómitos y *UMPS* rs1139538 y desarrollo de náuseas /vómitos y pérdida de peso/anorexia inducido por capecitabina.

Tabla 21. Regresión logística multivariante según modelos dominante y recesivo de las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Gen	SNP	Reacción adversa	Comparación	% Reacción adversa	p	OR	95% IC	FDR
CDA	rs12726436	Retraso de dosis	GG* vs AG/AA	34,9 / 57,1	0,005	2,743	1,346-5,588	0,018
	rs2072671	Síndrome mano-pie	AA* vs AC/CC	12,8 / 4,1	0,008	0,275	0,105-0,719	0,018
		Toxicidad global		52 / 37,9	0,007	0,500	0,301-0,831	0,018
DPYD	rs1048977	Hiperbilirrubinemia	CC* vs CT/TT	0,7 / 5,7	0,044	8,621	1,058-70,247	0,047
	rs12119882	Hiperbilirrubinemia	AA* vs AG/GG	2 / 10,8	0,031	4,861	1,160-20,382	0,042
	rs2270860	Toxicidad cutánea	TT vs CT/CC*	9,1 / 0,7	0,016	17,085	1,714-170,266	0,028
SLC22A7	rs4149178	Diarrea	AA* vs AG/GG	15,8 / 6,5	0,034	0,342	0,127-0,920	0,042
	rs2853741	Diarrea	CC vs CT/TT*	5,9 / 17,5	0,008	0,314	0,133-0,740	0,018
TYMS/ENOSF1	rs699517	Náuseas /vómitos	TT vs CT/CC*	13,6 / 2,2	0,014	7,938	1,513-41,639	0,028
		Pérdida de peso/anorexia		13,6 / 0,4	0,006	128,820	4,160-3988,960	0,018
		Astenia	CC* vs CT/TT	9,1 / 2,5	0,021	0,248	0,076-0,812	0,032
UMPS	rs2279199	Náuseas /vómitos	TT* vs CT/CC	7,3 / 1,4	0,036	0,210	0,049-0,900	0,042
	rs4678145	Astenia	GG* vs CG/CC	2,8 / 12,8	0,006	4,542	1,557-13,243	0,018

SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; p, valor de p; OR, del inglés, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; variables de confusión analizadas, sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia, PS, oxaliplatino, irinotecan y bevacizumab, FDR, del inglés, *False Discovery Rate*; *, genotipo de referencia en la comparación.

El retraso en la administración de sucesivas dosis de capecitabina debido a reacciones adversas fue menos frecuente para el genotipo GG de *CDA* rs1272636 que para los genotipos AG y AA (OR: 2,743; IC 95%: 1,346-5,588; p=0,005). *CDA* rs2072671 fue el único SNP asociado con síndrome mano-pie severo para los individuos homocigotos para el alelo A (OR: 0,275; IC 95%: 0,105-0,719; p=0,008). Este grupo de pacientes también presentó un alto riesgo de toxicidad global severa. Por su parte, los pacientes portadores del genotipo CC para el polimorfismo rs1048977 en *CDA* presentaron una menor probabilidad de desarrollar hiperbilirrubinemia que los pacientes que presentaban los genotipos CT y TT (OR: 8,621; IC 95%: 1,058-70,247; p=0,044).

DPYD rs12119882 fue asociado estadísticamente con hiperbilirrubinemia severa, de manera que los pacientes portadores del genotipo AA para dicho polimorfismo presentaron una menor probabilidad de desarrollar esta reacción adversa severa que los pacientes que presentaban los genotipos AG y GG (OR: 4,861; IC 95%: 1,160-20,382; p=0,031).

SLC22A7 rs2270860 fue el único SNP asociado con toxicidad cutánea severa para los individuos homocigotos para el alelo T (OR: 17,085; IC 95%: 1,714-170,266; p=0,016). Por su parte, el alelo A en homocigosis se asoció estadísticamente al desarrollo de diarrea severa para el SNP rs4149178 (OR: 0,342; IC 95%: 0,127-0,920; p=0,034).

Los pacientes portadores del genotipo CC para el polimorfismo rs2853741 en *TYMS* presentaron una menor probabilidad de desarrollar diarrea severa que los pacientes que presentaban los genotipos CT y TT (OR: 0,314; IC 95%: 0,133-0,740; p=0,008).

Respecto al polimorfismo rs699517 común a *TYMS* y *ENOSF1*, los pacientes portadores del genotipo TT presentaron una mayor probabilidad de desarrollar náuseas /vómitos y pérdida de peso/anorexia inducida por capecitabina que los pacientes que presentaban los genotipos CT/CC (OR: 7,938; IC 95%: 1,513-41,639; p=0,014 y OR: 128,820; IC 95%: 4,160-3988,960; p=0,006, respectivamente). Sin embargo, fue el alelo C en homocigosis el que se asoció a un riesgo mayor de astenia severa.

Por último, en relación al gen *UMPS*, los pacientes homocigotos para el alelo T del polimorfismo rs2279199 también mostraron una mayor probabilidad de sufrir náuseas /vómitos que los pacientes homocigotos y heterocigotos para el alelo C (OR: 0,210; IC

95%: 0,049-0,900; $p=0,036$). Por su parte, el estudio reveló que el riesgo de sufrir astenia severa fue menor en los individuos portadores del alelo G en homocigosis para el SNP rs4678145 en *UMPS* (OR: 4,542; IC 95%: 1,557-13,243; $p=0,006$).

El oxaliplatino como covariable resultó estadísticamente significativo en las asociaciones *CDA* rs12726436 con retraso de dosis y *CDA* rs2072671 con toxicidad global. Por su parte, bevacizumab mostró significancia estadística en la asociación *CDA* rs2072671 con toxicidad global. Por último, irinotecan resultó estadísticamente significativo en la asociación *SLC22A7* rs4149178 con diarrea.

A la vista de los resultados, la técnica de selección de tag-SNPs permitió identificar 10 SNPs asociados estadísticamente al desarrollo de reacciones adversas severas, retraso de dosis y toxicidad global.

4.2.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en genes candidatos mediante secuenciación de exomas

4.2.1.- Características basales de los pacientes

4.2.1.1.- Población global

En el presente estudio fueron incluidos 319 pacientes diagnosticados de CCR tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina, procedentes del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario Ramón y Cajal.

4.2.1.1.1.- Análisis de datos de pacientes y de tratamiento recibido

Los datos de pacientes y de tratamiento recibido fueron, como era de esperar, muy similares a los comentados previamente en el análisis de la población destinada al estudio de tag-SNPs, puesto que esta población difiere únicamente de la previa, en que el número de pacientes incluidos es ligeramente superior (319 vs 301 pacientes) por realizarse el análisis de datos en un momento posterior (septiembre de 2016 vs abril de 2016). Los 18 pacientes adicionales incluidos en esta población procedieron principalmente del Hospital Universitario 12 de Octubre y habían sido tratados en un porcentaje superior con regímenes adyuvantes en monoterapia con respecto a la población previa de 301 pacientes, de acuerdo a la práctica clínica habitual de este hospital.

Los datos demográficos y de tratamiento se detallan en la Tabla 22.

Tabla 22. Características basales y de tratamiento de la población global.

Parámetro	N (%)
Edad (años)	
Mediana de edad al diagnóstico	65 (30-88)
Sexo	
Hombres	168 (52,7%)
Mujeres	151 (47,3%)
Tipo de cáncer	
Colon	231 (72,4%)
Recto	88 (27,6%)
Estadio tumoral	
I-II	66 (20,7%)
III	127 (39,8%)
IV	126 (39,5%)
Hospital	
Hospital General Universitario Gregorio Marañón	123 (38,6%)
Hospital Universitario La Paz	19 (6,0%)
Hospital Universitario 12 de Octubre	171 (53,5%)
Hospital Universitario Ramón y Cajal	6 (1,9%)
Línea de tratamiento	
Adyuvante	156 (48,9%)
Metastásico	159 (49,8%)
Neoadyuvante	4 (1,3%)
Tipo de régimen	
Monoterapia	71 (22,3%)
Combinación	248 (77,7%)
Fármacos concomitantes	
Oxaliplatino	211 (66,1%)
Irinotecan	39 (12,2%)
Anticuerpos monoclonales	78 (24,5%)
Motivo de fin de tratamiento	
Petición del paciente	6 (1,9%)
Toxicidad inaceptable	57 (17,9%)
Progresión	79 (24,7%)
Fin de tratamiento	146 (45,8%)
Criterio médico	17 (5,3%)
Exitus	6 (1,9%)
Cirugía de rescate	8 (2,5%)
Reducción o retraso de dosis y retirada del fármaco por toxicidad	231 (72,4%)

4.2.1.1.2.- Análisis de reacciones adversas severas

Las reacciones adversas severas observadas con mayor frecuencia fueron las mismas que las encontradas previamente en el análisis de la población destinada al estudio de tag-SNPs: diarrea, toxicidad hematológica y síndrome mano-pie. Las frecuencias detalladas de las mismas pueden observarse en la Tabla 23.

Tabla 23. Reacciones adversas severas en la población global.

Reacciones adversas grado>2*	N (%)
Diarrea	39 (12,2%)
Toxicidad hematológica	32 (10,0%)
Síndrome mano-pie	24 (7,5%)
Reacción alérgica	17 (5,3%)
Astenia	16 (5,0%)
Nauseas/vómitos	11 (3,4%)
Hiperbilirrubinemia	11 (3,4%)
Hipertransaminemia	10 (3,1%)
Mucositis/estomatitis	5 (1,6%)
Pérdida de peso y anorexia	5 (1,6%)
Toxicidad cutánea	4 (1,3%)

*Reacciones adversas revisadas de acuerdo a la clasificación CTCAE v4.0 del NCI.

La prescripción de factores estimulantes de colonias granulocíticas (GCSF) debido a neutropenia fue necesaria en 22 pacientes (6,9%). La toxicidad global, definida por la presencia de cualquier reacción adversa de grado superior a 2, se puso de manifiesto en 135 pacientes (42,3%).

4.2.1.2.- Población seleccionada para el análisis de exomas

Se seleccionaron 8 pacientes para estudiar su exoma completo por haber experimentado toxicidad severa al tratamiento basado en capecitabina.

Los pacientes cuyo exoma completo fue secuenciado presentaron una mediana de edad al diagnóstico de 70 años (rango, 56-80 años). La distribución por sexo fue homogénea (4 hombres, 4 mujeres). Todos los pacientes habían sido diagnosticados de cáncer de colon excepto uno que fue diagnosticado de cáncer de recto. La combinación de

regímenes fue más frecuente que la capecitabina en monoterapia y estuvo basada XELOX en todos los casos.

En 4 pacientes el tratamiento fue metastásico. De éstos, en 3 pacientes el tratamiento finalizó por toxicidad inaceptable, mientras que en el cuarto finalizó por progresión de la enfermedad. Los otros 4 pacientes fueron tratados en adyuvancia pudiendo acabar el tratamiento sólo 2 de ellos. La reducción de dosis fue necesaria en la mitad de los pacientes y los retrasos de sucesivos ciclos de quimioterapia se pusieron de manifiesto en 2 de ellos.

Las toxicidades severas registradas fueron diarrea (presente en 6 pacientes), síndrome mano-pie (4 pacientes), mucositis / estomatitis (3 pacientes) y toxicidad hematológica (1 paciente). Las características de base de estos 8 pacientes seleccionados se muestran en la Tabla 24.

Por un estudio previo realizado en el laboratorio se conocía que ninguno de los individuos seleccionados presentaba las variantes rs67376798, rs3918290 y rs55886062 de *DPYD* asociadas con mayor riesgo de reacciones adversas severas a fluoropirimidinas.

Tabla 24. Características basales y de tratamiento de la población destinada al análisis de exomas.

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8
Edad en el momento del diagnóstico	63	80	71	56	70	58	70	74
Sexo	Hombre	Hombre	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Mujer	Mujer
Tipo de cáncer	Colon	Colon	Recto	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
Hospital	H. Gregorio Marañón	H. Gregorio Marañón	H. Gregorio Marañón	H. Gregorio Marañón	H. 12 de Octubre	H. 12 de Octubre	H. 12 de Octubre	H. 12 de Octubre
Estadio tumoral	IV	III	III	III	IV	IV	III	IV
Tratamiento recibido	XELOX	Capecitabina	XELOX	XELOX	XELOX	XELOX	Capecitabina	Capecitabina
Motivo de fin de tratamiento	Progresión	Toxicidad	Fin de tratamiento	Fin de tratamiento	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad	Toxicidad
Reducción de dosis por toxicidad	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí	No
Retraso de dosis por toxicidad	No	Sí	No	No	No	Sí	No	No
Retirada del fármaco por toxicidad	No	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Reacciones adversas severas grado>2 (grado)*	Diarrea (3), Mucositis / Estomatitis (3), Toxicidad hematológica (3)	Diarrea (4), Mucositis / Estomatitis (3)	Diarrea (3), Síndrome mano-pie (3)	Diarrea (4)	Diarrea (3), Mucositis / Estomatitis (3)	Diarrea (3), Síndrome mano-pie (3)	Síndrome mano-pie (3)	Síndrome mano-pie (3)

*Reacciones adversas revisadas de acuerdo a la clasificación CTCAE v4.0 del NCI; 1-8, pacientes.

4.2.2.- Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas

Se secuenciaron los exomas de 8 pacientes con toxicidad severa al tratamiento basado en capecitabina. En la secuenciación se leyó una media de 6.633.425.670 de pares de bases por paciente, la mayor parte de buena calidad. La media de lecturas fue de 42.189.288 con un tamaño medio por cada lectura de 156 nucleótidos. Más de 85% de los pocillos del chip de secuenciación masiva contenía *Ion Sphere™ Particles* (ISPs) de las cuales más del 99,8% eran válidas. Tras eliminar los fragmentos de test se obtuvo una media de 124.399.547 librerías para el alineamiento. La buena calidad de las librerías de amplicones fue reflejada con los siguientes datos: policlonalidad 25,48% (23,7-28,1%), lecturas de baja calidad 5,33% (2,6-7,1%), dímeros de oligonucleótidos 0,23% (0,1-0,4%) e ISPs finales de la librería 68,9% (66,8-73,5%). Los parámetros de calidad se detallan en las Tablas 25 y 26 de forma global y en particular para cada ensayo, respectivamente, así como en la Figura 13.

Tabla 25. Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas I.

	Media	Mínimo	Máximo
Pares de bases (pb)	6.633.425.670	4.687.028.703	8.136.238.531
>Q20 (en pb)	5.130.949.605	3.679.420.002	6.526.289.390
Número de lecturas	42.189.288	30.673.593	47.669.882
Longitud media de lectura (número de nucleótidos)	156	141	170
Nº Pocillos con ISPs (%)	126.917.750 (85,43%)	123.162.681 (82,90%)	131.145.789 (88,30%)
Nº ISPs válidas (%)	126.706.312 (99,85%)	123.045.729 (99,80%)	130.876.750 (99,90%)
Fragmentos test (%)	1.932.057 (1,83%)	166.537 (1,40%)	2.794.560 (2,20%)
Librerías (%)	124.399.547 (98,18%)	121.238.289 (97,80%)	128.082.190 (98,60%)
Policlonalidad (%)	31.740.504 (25,48%)	29.508.108 (23,70%)	35.703.469 (28,10%)
Lecturas de baja calidad (%)	6.610.457 (5,33%)	3.350.267 (2,60%)	8.667.435 (7,10%)
Dímeros de oligonucleótidos (%)	275.249 (0,23%)	157.902 (0,10%)	455.562 (0,40%)
ISPs para alineamiento (%)	85.799.470 (68,90%)	81.106.938 (66,80%)	94.184.038 (73,50%)

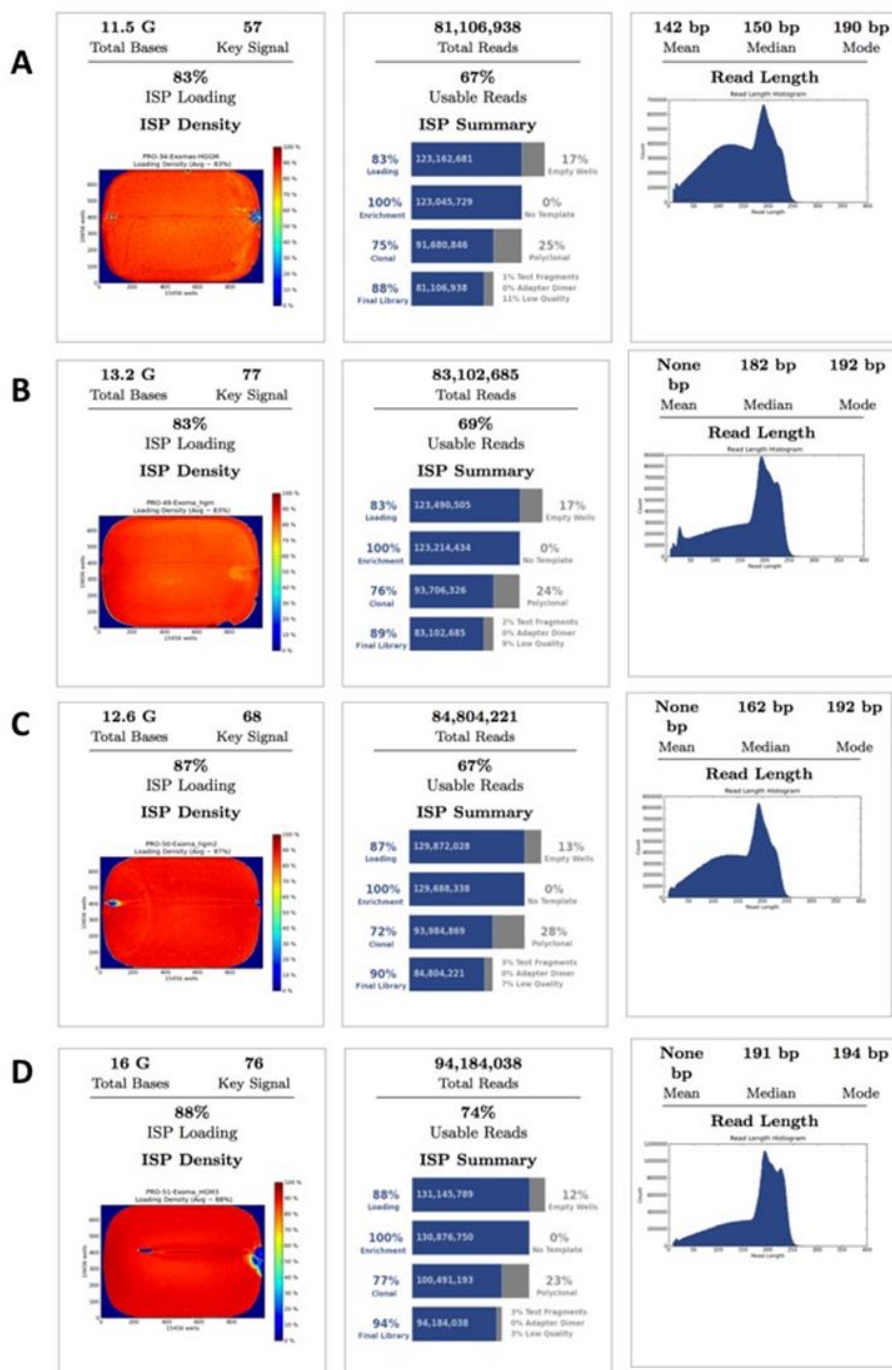
>Q20, número de pares de bases con una calidad superior a 20; ISP, del inglés, *Ion Sphere™ Particle*.

Tabla 26. Parámetros de calidad de la secuenciación de exomas II.

	Carrera 1			Carrera 2			Carrera 3			Carrera 4		
	Adaptador 11 Paciente 2	Adaptador 11 Paciente 2	Adaptador 12 Paciente 3	Adaptador 1 Paciente 1	Adaptador 2 Paciente 4	Adaptador 2 Paciente 4	Adaptador 3 Paciente 5	Adaptador 4 Paciente 6	Adaptador 5 Paciente 7	Adaptador 6 Paciente 8	Adaptador 7 Paciente 9	Adaptador 8 Paciente 10
Pares de bases (pb)	6.099.935.876	5.231.384.546	4.687.028.703	7.730.181.849	6.226.165.783	6.112.779.013	8.136.238.531	7.441.649.937				
>Q20 (en pb)	4.356.578.771	3.767.303.764	3.679.420.002	6.090.814.299	4.679.117.567	4.583.842.272	6.526.289.390	6.000.584.939				
Número de lecturas	43.049.602	36.440.301	30.673.593	47.399.124	41.376.943	41.284.788	47.669.882	43.871.090				
Longitud media de lectura (número de nucleótidos)	141	143	152	163	150	148	170	169				
Nº Pocihos con ISPs (%)	123.162.681 (82,90%)	123.490.505 (83,10%)	129.872.028 (87,40%)									
Nº ISPs válidas (%)	123.045.729 (99,90%)	123.214.434 (99,80%)	129.688.338 (99,90%)									
Fragmentos test (%)	166.537 (1,40%)	1.976.145 (1,60%)	2.790.987 (2,20%)									
Librerías (%)	121.380.359 (98,60%)	121.238.289 (98,40%)	126.897.351 (97,80%)									
Policlonalidad (%)	31.364.883 (25,80%)	29.508.108 (24,30%)	35.703.469 (28,10%)									
Lecturas de baja calidad (%)	8.667.435 (7,10%)	8.181.905 (6,70%)	6.242.222 (4,90%)									
Dímeros de oligonucleótidos (%)	242.104 (0,20%)	455.562 (0,40%)	157.902 (0,10%)									
ISPs para alineamiento (%)	81.106.938 (66,80%)	83.102.685 (68,50%)	84.804.221 (66,80%)									

>Q20, número de pares de bases con una calidad superior a 20; ISP, del inglés, *Ion Sphere™ Particle*.

Figura 13.- Control de calidad de la secuenciación masiva. Datos relativos a la densidad de *Ion Sphere™ Particles* (ISPs), lecturas útiles para el alineamiento y tamaño medio de lectura ofrecidos por el software Torrent Suite 4.2.1 (*Life Technologies*).



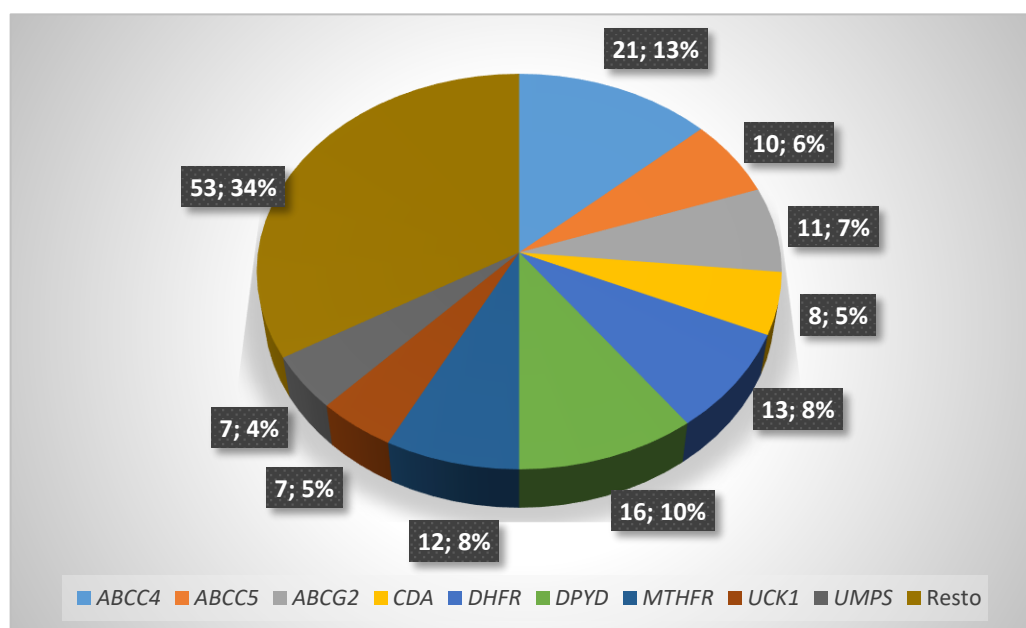
Las 8 muestras se secuenciaron por pares: A) muestras de individuos 2 y 3, B) muestras de individuos 1 y 4, C) muestras de individuos 5 y 6, y D) muestras de individuos 7 y 8.

4.2.3.- Variantes genéticas identificadas en la ruta de fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas

Un total de 158 SNPs e inserciones o deleciones localizados en genes pertenecientes a la ruta de las fluoropirimidinas fueron identificados en los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado.

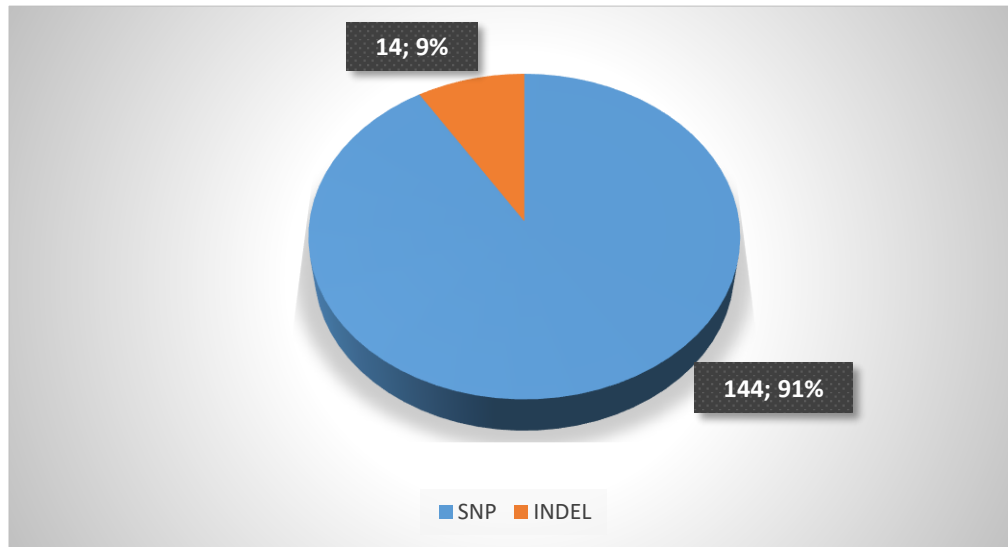
El 52% de las variantes identificadas se localizó en los genes *ABCC4* (13%), *DPYD* (10%), *DHFR* (8%), *MTHFR* (8%), *ABCG2* (7%) y *ABCC5* (6%). El resto de variaciones identificadas, con frecuencia inferior a 6%, estuvo localizado en los genes *CDA*, *DPYS*, *FPGS*, *GGH*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *SLC22A7*, *SLC29A1*, *SMUG1*, *TDG*, *UCK1*, *UCK2*, *UMPS*, *UPP2* y *XRCC3*. Ninguna variación fue identificada en los siguientes genes pertenecientes a la ruta de las fluoropirimidinas: *ABCC3*, *CES1*, *CES2*, *CYP2A6*, *ERCC2*, *TK1*, *TP53*, *TYMP*, *TYMS*, *UPB1* y *UPP1*. Estas 158 variantes fueron un 91% SNPs. La distribución del número y frecuencia de variaciones por gen y del tipo de variación se muestra en las Figuras 14 y 15, respectivamente.

Figura 14. Número y porcentaje de variaciones encontradas por gen de la ruta de las fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas.



Número de variaciones; porcentaje de variaciones; Resto, *DPYS*, *FPGS*, *GGH*, *PPAT*, *RRM1*, *RRM2*, *SLC22A7*, *SLC29A1*, *SMUG1*, *TDG*, *UCK2*, *UPP2* y *XRCC3*.

Figura 15. Número y porcentaje de variaciones encontradas por tipo de variación mediante secuenciación de exomas.



Número de variaciones; porcentaje de variaciones.

Del total de las 158 variaciones genéticas identificadas, se descartaron aquellas localizadas en regiones intrónicas y los exones que no contaban con suficiente cobertura, encontrándose finalmente 70 variaciones localizadas en regiones exónicas codificantes, 5'UTR, 3'UTR, sitios de *splicing* y regiones *upstream/downstream* (Tabla 27).

El número de variantes por paciente en estas regiones estuvo comprendido entre 13 y 40 tomando como comparador la secuencia de referencia genómica humana hg19.

Tabla 27. Variantes genéticas identificadas pertenecientes a la ruta de fluoropirimidinas mediante secuenciación de exomas.

Gen	Tipo	Posición	dbSNP ID	Sustitución aminoácídica	Sustitución nucleotídica	Localización	Función	1	2	3	4	5	6	7	8
ABCC4	SNP	95673791	rs3742106			3'UTR									
ABCC4	SNP	95714976	rs1751034	WT	c.3348G>A	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95726541	rs1189466	WT	c.2844T>C	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95727780	rs1678339	WT	c.2712A>G	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95858978	rs2274405	WT	c.969A>G	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95858996	rs2274406	WT	c.951A>G	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95861804	rs899494	WT	c.669T>C	exónica	sinónima								
ABCC4	SNP	95863008	rs11568658	p.Gly187Trp	c.559G>T	exónica	no sinónima								
ABCC4	SNP	95673938	rs9524765			sitio de <i>splicing</i>									
ABCC5	SNP	183660585	rs3749442	WT	c.3624C>T	exónica	sinónima								
ABCC5	SNP	183685534	rs939336	WT	c.1782T>C	exónica	sinónima								
ABCC5	SNP	183696402	rs1132776	WT	c.1185T>C	exónica	sinónima								
ABCC5	SNP	183699516	rs7636910	WT	c.1146A>G	exónica	sinónima								
ABCG2	SNP	89052323	rs2231142	p.Gln141Lys	c.421C>A	exónica	no sinónima								
ABCG2	SNP	89061114	rs2231137	p.Val12Met	c.34G>A	exónica	no sinónima								
CDA	INDEL	20915589	rs3215400			5'UTR									
CDA	SNP	20915701	rs2072671	p.Lys27Gln	c.79A>C	exónica	no sinónima								
CDA	SNP	20945055	rs1048977	WT	c.435C>T	exónica	sinónima								
CDA	SNP	20945064	rs72650823			3'UTR									
DHFR	INDEL	79950699	rs201874762			5'UTR									
DHFR	SNP	79950657	rs146523896			5'UTR									
DHFR	SNP	79950724	rs2001675			5'UTR									
DHFR	SNP	79950733	rs2405876			5'UTR									
DHFR	SNP	79950736	rs2405877			5'UTR									
DHFR	SNP	79950781	rs1650697			5'UTR									
DHFR	SNP	79950741	rs144629981			5'UTR									
DPYD	INDEL	97770848	Nuevo	p.Ile756Asp	c.2264_2265insG	exónica	<i>frameshift</i>								

Resultados

Gen	Tipo	Posición	dbSNP ID	Sustitución aminoacídica	Sustitución nucleotídica	Localización	Función	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>DPYD</i>	SNP	97770920	rs1801160	p.Val732Ile	c.2194G>A	exónica	no sinónima								
<i>DPYD</i>	SNP	97981395	rs1801159	p.Ile543Val	c.1627A>G	exónica	no sinónima								
<i>DPYD</i>	SNP	97981421	rs1801158	p.Ser534Asn	c.1601G>A	exónica	no sinónima								
<i>DPYD</i>	SNP	98165091	rs2297595	p.Met166Val	c.496A>G	exónica	no sinónima								
<i>DPYD</i>	SNP	98348885	rs1801265	p.Arg29Cys	c.85C>T	exónica	no sinónima								
<i>DPYS</i>	SNP	105479149	rs2959023			5'UTR									
<i>FPGS</i>	SNP	130565267	rs10760502	p.Ile222Val	c.64A>G	exónica	no sinónima								
<i>FPGS</i>	SNP	130566668	rs34330923	WT	c.243G>A	exónica	sinónima								
<i>GGH</i>	INDEL	63951288	Nuevo	p.Leu14Ala	c.38_39insG	exónica	<i>frameshift</i>								
<i>GGH</i>	SNP	63951237	rs11545077	p.Ala31Thr	c.91G>A	exónica	no sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11850750	rs35737219	p.Thr653Met	c.1958C>T	exónica	no sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11850927	rs2274976	p.Arg594Gln	c.1781G>A	exónica	no sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11854457	rs4846051	WT	c.1305C>T	exónica	sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11854896	rs2066462	WT	c.1056C>T	exónica	sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11856378	rs1801133	p.Ala222Val	c.665C>T	exónica	no sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11863057	rs2066470	WT	c.117C>T	exónica	sinónima								
<i>MTHFR</i>	SNP	11866442	rs111334345			<i>upstream</i>									
<i>PPAT</i>	SNP	57268328	rs2271924	WT	c.681A>G	exónica	sinónima								
<i>PPAT</i>	SNP	57273840	rs11538098	WT	c.171G>C	exónica	sinónima								
<i>RRM1</i>	SNP	4141132	rs183484	WT	c.850C>A	exónica	sinónima								
<i>RRM1</i>	SNP	4159457	rs9937	WT	c.2223A>G	exónica	sinónima								
<i>RRM1</i>	SNP	4159466	rs1042858	WT	c.2232G>A	exónica	sinónima								
<i>RRM2</i>	SNP	10262859	rs72542787			<i>upstream</i>									
<i>RRM2</i>	SNP	10262920	rs1130609			5'UTR									
<i>RRM2</i>	SNP	10268999	rs61754475	WT	c.823C>T	exónica	sinónima								
<i>SLC22A7</i>	SNP	43270097	rs2651184	WT	c.1215T>C	exónica	sinónima								
<i>SLC22A7</i>	SNP	43270151	rs2270860	WT	c.1269C>T	exónica	sinónima								
<i>SLC22A7</i>	SNP	43273604	rs2242416			<i>downstream</i>									
<i>SMUG1</i>	SNP	54575458	rs971			3'UTR									
<i>SMUG1</i>	SNP	54575800	rs2233921			3'UTR									

Gen	Tipo	Posición	dbSNP ID	Sustitución aminoacídica	Sustitución nucleotídica	Localización	Función	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>TDG</i>	SNP	104376693	rs4135113	p.Gly199Ser	c.595G>A	exónica	no sinónima								
<i>UCK1</i>	SNP	134398249	rs10122068			<i>downstream</i>									
<i>UCK1</i>	SNP	134398534	rs3739495			<i>downstream</i>									
<i>UCK1</i>	SNP	134401335	rs2296957	WT	c.633G>A	exónica	sinónima								
<i>UCK1</i>	SNP	134406502	Nuevo	p.His20Gln	c.60C>G	exónica	no sinónima								
<i>UCK2</i>	SNP	165865478	rs11553301	WT	c.408G>A	exónica	sinónima								
<i>UMPS</i>	INDEL	124462986	rs3836305			3'UTR									
<i>UMPS</i>	SNP	124449209	rs2279198			<i>upstream</i>									
<i>UMPS</i>	SNP	124449252	rs2279199			5'UTR									
<i>UMPS</i>	SNP	124449291	rs1139538			5'UTR									
<i>UPP2</i>	INDEL	158958551	rs74924675			5'UTR									
<i>UPP2</i>	SNP	158958605	rs6710480	p.Arg10Ser	c.30G>T	exónica	no sinónima								
<i>XRCC3</i>	SNP	104165753	rs861539	p.Thr241Met	c.722C>T	exónica	no sinónima								
TOTAL DE VARIANTES POR PACIENTE									13	33	31	28	25	40	32

dbSNP ID, Número de identificación de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information SNP database*; SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; INDEL, inserción/delección; UTR, del inglés, *Untranslated Region*; 1-8, pacientes; casilla blanca, genotipo WT; casilla sombreada, presencia de la variación.

4.2.3.1.- Análisis individualizado de las variantes identificadas por paciente

A continuación se detalla el análisis de las variaciones por paciente a partir de aquellas 70 variaciones totales localizadas en regiones exónicas codificantes, 5'UTR, 3'UTR, sitios de *splicing* y regiones *upstream/downstream*:

- Paciente 1: se identificaron 13 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 5 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 2 en regiones *upstream/downstream* y 6 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 2 eran no sinónimas (*CDA* p.Lys27Gln y *MTHFR* p.Ala222Val) y 4 sinónimas.
- Paciente 2: se identificaron 33 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 12 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 3 en regiones *downstream*, 1 en sitio de *splicing* y 17 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 4 eran no sinónimas (*CDA* p.Lys27Gln, *DPYD* p.Ile543Val, *DPYD* p.Cys29Arg y *UPP2* p.Arg10Ser) y 13 sinónimas.
- Paciente 3: se identificaron 31 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 6 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 2 en regiones *downstream*, 1 en sitio de *splicing* y 22 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 6 eran no sinónimas (*DPYD* p.Val732Ile, *DPYD* p.Ile543Val, *GGH* p.Ala31Thr, *MTHFR* p.Ala222Val, *TDG* p.Gly199Ser y *XRCC3* p.Thr241Met) y 16 sinónimas.
- Paciente 4: se identificaron 28 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 6 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 4 en regiones *upstream/downstream* y 18 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 4 eran no sinónimas (*ABCG2* p.Gln141Lys, *DPYD* p.Ile543Val, *MTHFR* p.Arg594Gln y *MTHFR* p.Ala222Val) y 14 sinónimas.

- Paciente 5: se identificaron 28 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 7 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 4 en regiones *upstream/downstream*, 1 en sitio de *splicing* y 16 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 1 era no sinónima (*ABCG2* p.Gln141Lys) y 15 sinónimas.
- Paciente 6: se identificaron 25 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 7 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 4 en regiones *upstream/downstream* y 14 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 5 eran no sinónimas (*ABCG2* p.Val12Met, *CDA* p.Lys27Gln, *DPYD* p.Ser534Asn, *MTHFR* p.Ala222Val y *UCK1* p.His20Gln) y 9 sinónimas.
- Paciente 7: se identificaron 40 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 7 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 6 en regiones *upstream/downstream*, 1 en sitio de *splicing* y 26 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 7 eran no sinónimas (*ABCC4* p.Gly187Trp, *DPYD* p.Val732Ile, *DPYD* p.Met166Val, *FPGS* p.Ile22Val, *GGH* p.Ala31Thr, *MTHFR* p.Thr653Met y *MTHFR* p.Ala222Val), 2 *frameshift* (*DPYD* p.Ile756Asp y *GGH* p.Leu14Ala) y 17 sinónimas.
- Paciente 8: se identificaron 32 variaciones en la ruta de las fluoropirimidinas de las cuales 9 se encontraban en regiones 3'UTR o 5'UTR, 4 en regiones *downstream*, 1 en sitio de *splicing* y 18 en regiones exónicas codificantes. De las variaciones presentes en regiones codificantes, 2 eran no sinónimas (*MTHFR* p.Ala222Val y *UPP2* p.Arg10Ser) y 16 sinónimas.

4.2.3.2.- Análisis de las variantes genéticas no sinónimas y *frameshift* en regiones codificantes

Tras la identificación de las 70 variantes en los 33 genes de la ruta de las fluoropirimidinas localizadas en regiones exónicas codificantes, 5'UTR, 3'UTR, sitios de *splicing* y regiones *upstream/downstream*, y dado que la secuenciación realizada está optimizada para exones, se seleccionaron las variantes no sinónimas y *frameshift*, presentes siempre en regiones codificantes, para un análisis más exhaustivo.

Se obtuvieron 45 variantes genéticas en regiones exónicas codificantes, de las cuales 20 eran no sinónimas o *frameshift* localizadas en 11 genes de la ruta de fluoropirimidinas: *ABCC4*, *ABCG2*, *CDA*, *DPYD*, *FPGS*, *GGH*, *MTHFR*, *TDG*, *UCK1*, *UPP2* y *XRCC3*. Los genes con mayor número de variantes implicadas fueron *DPYD* (n=6) y *MTHFR* (n=3). Las variantes genéticas presentadas con mayor frecuencia por los pacientes fueron *MTHFR* rs1801133 (6 de 8 pacientes) y *CDA* rs2072671 y *DPYD* rs1801159 (ambas en 3 de 8 pacientes) (Tabla 28).

Estas 20 variantes genéticas no sinónimas o *frameshift* localizadas en regiones exónicas codificantes fueron genotipadas por métodos diferentes (secuenciación de Sanger, SNaPshot, LightSNiPs o genotipado mediante PCR a tiempo real con sondas TaqMan™) siendo confirmadas 17 de ellas. Las restantes 3 variantes localizadas en los genes *DPYD*, *GGH* y *UCK1*, no descritas en la literatura, resultaron ser artefactos de la secuenciación masiva tras la comprobación por secuenciación de Sanger (genotipo marcado como X en la Tabla 28).

Tabla 28. Variantes genéticas no sinónimas pertenecientes a la ruta de fluoropirimidinas identificadas en regiones codificantes.

Gen	Tipo	dbSNP ID	Sustitución aminoacídica	Sustitución nucleotídica	Localización	1	2	3	4	5	6	7	8
ABCC4	SNP	rs11568658	p.Gly187Trp	c.559G>T	exónica							GT	
	SNP	rs2231137	p.Val12Met	c.34G>A	exónica						GA		
	SNP	rs2231142	p.Gln141Lys	c.421C>A	exónica				CA	CA			
CDA	SNP	rs2072671	p.Lys27Gln	c.79A>C	exónica	AC	AC				AC		
	SNP	rs1801158	p.Ser534Asn	c.1601G>A	exónica						AG		
DPYD	SNP	rs1801159	p.Ile543Val	c.1627A>G	exónica		GA	GA	GA				
	SNP	rs1801265	p.Cys29Arg	c.85C>T	exónica		CC						
	SNP	rs1801160	p.Val732Ile	c.2194G>A	exónica			GA				GA	
	SNP	rs2297595	p.Met166Val	c.496A>G	exónica							AG	
	INDEL	Nueva	p.Ile756Asp	c.2264_2265insG	exónica							X	
	SNP	rs10760502	p.Ile22Val	c.64A>G	exónica							AG	
FGS	SNP	rs11545077	p.Ala31Thr	c.91G>A	exónica			AA				GA	
	INDEL	Nueva	p.Leu14Ala	c.38_39insG	exónica							X	
MTHFR	SNP	rs1801133	p.Ala222Val	c.665C>T	exónica	CT		CT	CT		CT	CT	CT
	SNP	rs2274976	p.Arg594Gln	c.1781G>A	exónica				GA				
	SNP	rs35737219	p.Thr653Met	c.1958C>T	exónica							CT	
TDG	SNP	rs4135113	p.Gly199Ser	c.595G>A	exónica			GA					
	SNP	Nueva	p.His20Gln	c.60C>G	exónica						X		
UPP2	SNP	rs6710480	p.Arg10Ser	c.30G>T	exónica		GT						GT
XRCC3	SNP	rs861539	p.Thr241Met	c.722C>T	exónica			CT					

dbSNP ID, Número de identificación de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information SNP database*; 1-8, pacientes; SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*; INDEL, inserción/delección; casilla blanca, genotipo WT; casilla clara sombreada, variante en heterocigosis; casilla sombreada oscura, variante en homocigosis; X, variación secuenciada pero no confirmada.

4.2.3.3.- Análisis de la predicción del efecto de las variantes *in silico*

El estudio *in silico* de la predicción del efecto de las variantes genéticas sobre la funcionalidad de las proteínas se realizó sobre las 17 variantes genéticas no sinónimas identificadas y verificadas, pertenecientes a regiones exónicas codificantes, localizadas en los siguientes genes de la ruta de las fluoropirimidinas *ABCC4*, *ABCG2*, *CDA*, *DPYD*, *FPGS*, *GGH*, *MTHFR*, *TDG*, *UPP2* y *XRCC3* (Tabla 29).

Dicho análisis reveló que 5 de estas variaciones, rs11568658 en *ABCC4*, rs1801158, rs1801160 y rs2297595 en *DPYD* y rs1801133 en *MTHFR*, estaban clasificadas como dañinas por SIFT y probablemente dañinas por PolyPhen-2. Por su parte, el SNP rs4135113 en *TDG* fue clasificado como dañino por SIFT mientras que el SNP rs861539 en *XRCC3* fue clasificado como posiblemente dañino por PolyPhen-2. Los restantes 10 polimorfismos fueron clasificados como tolerados por SIFT y benignos por PolyPhen-2.

Tabla 29. Predicción del efecto de las variantes genéticas *in silico*.

Gen	dbSNP ID	Sustitución aminoacídica	Sutitución nucleotídica	SIFT	PolyPhen-2
ABCC4	rs11568658	p.Gly187Trp	c.559G>T	Dañina (0,0)	Probablemente dañina (0,996)
	rs2231137	p.Val12Met	c.34G>A	Tolerada (1,0)	Benigna (0,0)
ABCG2	rs2231142	p.Gln141Lys	c.421C>A	Tolerada (0,06)	Benigna (0,372)
	rs2072671	p.Lys27Gln	c.79A>C	Tolerada (0,49)	Benigna (0,002)
DPYD	rs1801158	p.Ser534Asn	c.1601G>A	Dañina (0,0)	Probablemente dañina (0,996)
	rs1801159	p.Ile543Val	c.1627A>G	Tolerada (1,0)	Benigna (0,0)
	rs1801265	p.Cys29Arg	c.85C>T	Tolerada (0,38)	Benigna (0,0)
	rs1801160	p.Val732Ile	c.2194G>A	Dañina (0,01)	Probablemente dañina (0,998)
	rs2297595	p.Met166Val	c.496A>G	Dañina (0,0)	Probablemente dañina (1,0)
FPGS	rs10760502	p.Ile22Val	c.64A>G	Tolerada (1,0)	Benigna (0,0)
GGH	rs11545077	p.Ala31Thr	c.91G>A	Tolerada (0,10)	Benigna (0,0)
	rs1801133	p.Ala222Val	c.665C>T	Dañina (0,0)	Probablemente dañina (0,998)
MTHFR	rs2274976	p.Arg594Gln	c.1781G>A	Tolerada (1,0)	Benigna (0,0)
	rs35737219	p.Thr653Met	c.1958C>T	Tolerada (0,18)	Benigna (0,002)
TDG	rs4135113	p.Gly199Ser	c.595G>A	Dañina (0,05)	Benigna (0,432)
UPP2	rs6710480	p.Arg10Ser	c.30G>T	Tolerada (0,69)	Benigna (0,001)
XRCC3	rs861539	p.Thr241Met	c.722C>T	Tolerada (0,13)	Posiblemente dañina (0,541)

dbSNP ID, Número de identificación de acuerdo al *National Center for Biotechnology Information SNP database*; SIFT, del inglés, *Sorting Intolerant From Tolerant*; PolyPhen-2, del inglés, *Polymorphism Phenotyping v2*.

4.2.4.- Validación de la asociación de polimorfismos genéticos a reacciones adversas severas al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en la población global

Los SNPs rs11568658 (*ABCC4*), rs1801158, rs1801160 y rs2297595 (*DPYD*) y rs1801133 (*MTHFR*), cuyo impacto en la estructura y función de las proteínas humanas fue considerado como dañino y probablemente dañino por las puntuaciones SIFT y PolyPhen-2 respectivamente (Tabla 29), fueron genotipados en la población global de 319 pacientes con el fin de analizar sus asociaciones con reacciones adversas severas, toxicidad global, reducción o retraso de dosis y retirada de capecitabina por toxicidad.

En la Tabla 30 se muestran los valores de p obtenidos en el análisis univariante mediante el test χ^2 de Pearson de asociación lineal por lineal bajo un modelo codominante. Se obtuvieron 3 asociaciones estadísticamente significativas: *DPYD* rs1801160 con síndrome mano-pie ($p=0,037$) y toxicidad global ($p=0,010$) y *MTHFR* rs1801133 con retraso de dosis ($p=0,033$).

En las tablas de contingencia con estas asociaciones estadísticamente significativas se pueden observar los porcentajes de pacientes para cada genotipo que presentaron toxicidad severa (Tabla 31).

Tabla 30. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas en la población global. Se resaltan en rojo aquéllos valores de p estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

	ABCC4 rs11568658	DPYD rs1801158	DPYD rs1801160	DPYD rs2297595	MTHFR rs1801133
Náuseas /vómitos	0,608	1	0,728	0,342	1
Diarrea	0,223	0,187	0,091	0,864	0,710
Mucositis/estomatitis	1	1	1	0,504	0,340
Hiperbilirrubinemia	0,608	0,075	1	0,342	0,382
Hipertransaminemia	0,611	0,066	0,638	0,576	0,642
Pérdida de peso/anorexia	1	1	1	0,104	0,340
Toxicidad cutánea	0,299	1	1	0,707	1
Síndrome mano-pie	1	1	0,037	0,834	0,645
Toxicidad hematológica	1	0,432	0,791	0,453	0,586
Reacción alérgica	1	0,684	0,278	0,822	0,366
Astenia	0,378	0,131	0,262	0,623	0,577
Reducción de dosis	0,840	1	0,637	0,365	0,934
Retraso de dosis	0,685	1	0,871	0,162	0,033
Retirada de tratamiento	0,080	0,147	0,732	0,903	0,329
Toxicidad global	0,222	1	0,010	0,364	0,620

Tabla 31. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en la población global. Análisis univariante según modelo codominante.

Gen	Genotipo	n	% Reacción adversa	p	Reacción adversa
<i>DPYD</i> rs1801160	GG	275	6,5	0,037	Síndrome mano-pie
	GA	42	11,9		
	AA	1	100		
	GG	275	39,5	0,010	Toxicidad global
	GA	42	59,5		
	AA	1	100		
<i>MTHFR</i> rs1801133	CC	128	44,5	0,033	Retraso de dosis
	CT	148	32,4		
	TT	43	32,6		

n, número de pacientes; p, valor de p.

El polimorfismo *DPYD* rs1801160 se asoció significativamente con síndrome mano-pie y toxicidad global. En ambos casos, el alelo A resultó estar relacionado con un mayor riesgo de desarrollar el efecto adverso severo.

El polimorfismo *MTHFR* rs1801133 se asoció significativamente con retraso de dosis, de tal manera que los pacientes portadores en homocigosis del alelo C tenían retraso de dosis más frecuentemente (44,5%) que los portadores de la variante T tanto en heterocigosis como en homocigosis.

Tras el análisis univariante, para verificar que las asociaciones obtenidas entre dichos polimorfismos y reacciones adversas severas no estaban siendo distorsionadas por otros factores, las 3 asociaciones estadísticamente significativas entre polimorfismos y efectos adversos severos al tratamiento con capecitabina se sometieron a una regresión logística multivariante según modelos dominante y recesivo. Las variables de confusión analizadas fueron sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia y fármacos concomitantes (oxaliplatino e irinotecan).

Dos de las tres asociaciones se mantuvieron estadísticamente significativas al tener en cuenta estas variables de confusión: *DPYD* rs1801160 con toxicidad global ($p=0,029$) y *MTHFR* rs1801133 con retraso de dosis ($p=0,047$) (Tabla 32).

Tabla 32. Regresión logística multivariante según modelos dominante y recesivo de las asociaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre polimorfismos y reacciones adversas severas en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en la población global.

Gen	Reacción adversa	Comparación	% Reacción adversa	p	OR	95% CI
<i>DPYD</i> rs1801160	Toxicidad global	GG* vs GA/AA	39,6 / 58,1	0,029	2,113	1,080-4,135
<i>MTHFR</i> rs1801133	Retraso de dosis	CC* vs CT/TT	44,5 / 32,3	0,047	0,615	0,381-0,993

p, valor de p; OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; variables de confusión analizadas, sexo, tipo de cáncer, hospital de procedencia, oxaliplatino e irinotecan; *, genotipo de referencia en la comparación.

Los pacientes portadores del alelo A tanto en homocigosis como en heterocigosis para el polimorfismo rs1801160 en *DPYD* presentaron una mayor probabilidad de desarrollar toxicidad global que los pacientes que presentaban el genotipo GG (OR: 2,113; IC 95%: 1,080-4,135; $p=0,029$). A su vez los pacientes homocigotos para el alelo C del polimorfismo rs1801133 en *MTHFR* también mostraron una mayor probabilidad de sufrir retrasos de dosis que los pacientes homocigotos y heterocigotos para el alelo T (OR: 0,615; IC 95%: 0,381-0,993; $p=0,047$).

El oxaliplatino como covariable resultó de forma independiente estadísticamente significativo en ambas asociaciones.

A la vista de los resultados, la técnica de secuenciación masiva de exomas permitió identificar 2 SNPs en los genes *DPYD* y *MTHFR* asociados estadísticamente al desarrollo de toxicidad severa.

4.2.4.1.- Análisis del efecto acumulativo de las variantes en *DPYD* sobre las reacciones adversas severas

Debido a la relevancia de *DPYD* en el metabolismo de fluoropirimidinas, y a que las variantes identificadas en los pacientes por secuenciación de exomas son relativamente frecuentes y se ha documentado un efecto pequeño sobre la funcionalidad de la proteína, se llevó a cabo el estudio en la población global para evaluar el posible efecto acumulativo de las mismas. Las variantes analizadas fueron rs1801158, rs1801159,

rs1801160, rs1801265 y rs2297595, descritas previamente como variantes genéticas no sinónimas. Para ello, se elaboró una puntuación basada en el número de estas variantes presentes en cada individuo. En todos los pacientes, el genotipo salvaje homocigoto puntuó 0, el heterocigoto 1 y el homocigoto mutante 2, tal y como se describe en material y métodos.

A pesar de que no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre esta puntuación y las reacciones adversas severas, el grupo de pacientes con más de 3 puntos mostró mayor porcentaje de hiperbilirrubinemia (10,0 vs 3,2%), síndrome mano-pie (10,0% vs 7,4%) y astenia (10,0% vs 4,9%). Además estos pacientes mostraron un mayor porcentaje de prescripción de factores estimulantes de colonias debido a neutropenia (20,0% vs 6,5%), retraso en el tratamiento, reducción de dosis o retirada de capecitabina por toxicidad (90,0% vs 71,8%) y toxicidad global (60,0% vs 41,7%) (Tabla 33).

Tabla 33. Frecuencias de reacciones adversas en pacientes tratados con capecitabina en función de la puntuación obtenida en base a la presencia de variantes de riesgo en *DPYD* (rs1801158, rs1801159, rs1801160, rs1801265 y rs2297595).

Reacción adversa	% de reacción adversa por grupo: 0-3 vs 4-10 (n= 309 vs 10)	p
Prescripción de GCSF	6,5% vs 20,0%	0,146
Reducción o retraso de dosis y retirada de fármaco por toxicidad	71,8% vs 90,0%	0,295
Hiperbilirrubinemia	3,2% vs 10,0%	0,300
Toxicidad global	41,7% vs 60,0%	0,333
Síndrome mano-pie	7,4% vs 10,0%	1,000
Nauseas/vómitos	3,6% vs 0%	1,000
Diarrea	12,3 vs 10,0%	1,000
Mucositis/estomatitis	1,6% vs 0%	1,000
Hipertransaminemia	3,2% vs 0%	1,000
Pérdida de peso y anorexia	1,6% vs 0%	1,000
Toxicidad cutánea	1,3% vs 0%	1,000
Toxicidad hematológica	10,0% vs 10,0%	1,000
Astenia	4,9% vs 10,0%	1,000

p, valor de p; GCSF: factores estimulantes de colonias granulocíticas.

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

El presente estudio ha tenido como finalidad la identificación de asociaciones entre polimorfismos genéticos y reacciones adversas severas al tratamiento quimioterápico basado en capecitabina en pacientes con CCR en cualquier estadio de la enfermedad. Para ello se ha recurrido a 2 aproximaciones experimentales, como son la selección de tag-SNPs en genes seleccionados y la secuenciación masiva de exomas y posterior análisis de todos los genes conocidos por participar en la farmacocinética y farmacodinamia de las fluoropirimidinas. De esta manera, se han identificado 12 variantes genéticas, la mayoría sin una asociación descrita con toxicidad a capecitabina ni a 5-FU previa, que podrían contribuir a ampliar el conocimiento existente en la prevención de reacciones adversas graves a estos tratamientos quimioterápicos. Estos resultados, que son preliminares y deben ser validados en una población mayor de pacientes, podrían ser de gran utilidad en el tratamiento del CCR, ayudando a seleccionar tratamientos con menor probabilidad de desencadenar reacciones adversas severas y contribuyendo a la mejora asistencial y a la calidad de vida de los pacientes.

Las fluoropirimidinas, empleadas en el tratamiento de diversos tipos de tumores, han sido tradicionalmente, y todavía siguen siendo, la base de la terapia del CCR. Su combinación con distintos fármacos en esquemas únicos de tratamiento ha logrado un aumento en las cifras de supervivencia pero, desgraciadamente, también un incremento de las reacciones adversas que ya de por sí, no son escasas en los enfoques basados en monoterapia¹⁴⁴. Además, las reacciones adversas, provocan a menudo reducciones de dosis, retrasos en la administración de sucesivos ciclos de quimioterapia y suspensiones de tratamiento, limitando en multitud de pacientes alcanzar las cifras de eficacia señaladas en los ensayos clínicos⁷⁴. Por tanto, la toxicidad asociada a este tipo de fármacos es uno de los principales problemas a los que diariamente se enfrentan oncólogos y pacientes siendo ésta a menudo severa y pudiendo llegar a ser, en ocasiones, letal.

Poder predecir qué pacientes van a desarrollar efectos adversos a estos fármacos es una necesidad urgente y constituye uno de los objetivos de la farmacogenética. No obstante y, a pesar de la evidencia disponible sobre la toxicidad de las fluoropirimidinas, los

estudios cuyo objetivo principal es el análisis de dicha toxicidad, desarrollados principalmente en el ámbito del CCR y en menor medida en cáncer de mama, son mayoritariamente recientes^{166,173,227}. Ello es debido a que tradicionalmente se han focalizado más en el análisis de la efectividad utilizando variables perfectamente definidas como tasa de respuesta, supervivencia global y supervivencia libre de progresión^{228,229}.

Cabe destacar que, con el fin de identificar biomarcadores de toxicidad a fluropirimidinas y ante esta urgente necesidad, la población evaluada en esta memoria ya fue parcialmente empleada en estudios previos por parte del grupo de investigación del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Hospital Gregorio Marañón. Entre otros hallazgos, se identificaron asociaciones estadísticas entre algunos polimorfismos en *ABCC1* (rs1128503, rs2032592 y rs1045642), *CDA* (rs2072671), *TYMS* (rs45445694) y *ENOSF1* (rs2612091) y reacciones adversas severas, estableciéndose asimismo un perfil diferencial entre marcadores para 5-FU y para capecitabina^{83,197,216}. También se identificaron polimorfismos asociados a toxicidad a oxaliplatino e irinotecan, fármacos que se administran conjuntamente con las fluoropirimidinas, lo cual es relevante dada la frecuencia de prescripción de regímenes combinados²³⁰. No obstante y a pesar de los hallazgos encontrados, la información disponible en cuanto a variantes genéticas asociadas a reacciones adversas a fluoropirimidinas continuaba siendo insuficiente.

En el presente trabajo, que contó con una población mayor de pacientes a las previamente estudiadas, se pudieron identificar nuevos polimorfismos genéticos asociados a toxicidad, algunos de los cuales se localizaron en genes que no habían sido relacionados previamente.

Los SNPs identificados en la presente memoria podrían utilizarse para mejorar el poder predictivo de los actuales test genéticos para predecir toxicidad a la quimioterapia en CCR. La situación ideal es aquella en la que con un simple test genético podamos identificar pacientes con elevado riesgo de sufrir reacciones adversas severas al tratamiento con capecitabina o 5-FU. Sin embargo, los actuales test farmacogenéticos utilizados para estos fármacos, desarrollados e implementados en varios hospitales para predecir toxicidad, son claramente insuficientes y dispares en cuanto a los genes

seleccionados, lo que supone que una gran proporción de pacientes continúen experimentando reacciones adversas severas. Hasta el momento, sólo unos pocos biomarcadores farmacogenéticos, como por ejemplo algunas variantes en *DPYD*, en mayor medida y *TYMS* y *MTHFR* con muchos interrogantes, son aplicados de forma no generalizada en la farmacogenética del CCR siendo su implementación en la práctica clínica rutinaria muy limitada¹⁶⁸. Algunos test comerciales, que engloban al menos 17 polimorfismos, muestran valores predictivos positivos de hasta 73% (IC 95%, 45-91%) y valores predictivos negativos de 68% (IC 95%, 64%-71%), como señalan Rosmarin y colaboradores (cols.). Estos autores sugieren la exclusión de varios polimorfismos injustificados, lo que conduciría a un mejor rendimiento. Incluso entonces, el poder predictivo sería modesto, poniéndose una vez más de manifiesto la necesidad de identificar y validar biomarcadores farmacogenéticos adicionales asociados a toxicidad por fluoropirimidinas en cohortes más grandes que soporten su paulatina implementación¹⁸¹. Mejorando el poder predictivo de los test actuales, podría mejorarse el coste/efectividad del tratamiento con estos fármacos¹⁶².

Antes de analizar y discutir las asociaciones encontradas merece la pena profundizar en el análisis de las características basales de la cohorte de pacientes. Éste no reveló diferencias reseñables en cuanto a la distribución por sexo, lo cual es importante debido a la evidencia encontrada en la literatura acerca de la influencia del sexo y del tipo de cáncer de los pacientes en la respuesta al tratamiento quimioterápico^{188,231}. Además, el sexo de los pacientes y el tipo de cáncer, fueron incluidos como variables de confusión en los análisis multivariantes no resultando estadísticamente significativos en ninguna de las asociaciones identificadas. En cuanto a la procedencia de los pacientes, más del 90% de los mismos pertenecían a los hospitales Gregorio Marañón y 12 de Octubre y sólo una escasa proporción a los hospitales La Paz y Ramón y Cajal. En este sentido, cabe destacar que los 18 pacientes de diferencia entre la población analizada en el estudio de tag-SNPs y de exomas procedieron en su mayoría del Hospital 12 de Octubre. La inclusión de estos 18 pacientes es la causante de las pequeñas diferencias observadas entre las 2 poblaciones a estudio. Por ejemplo, el 46,5% de pacientes con tratamiento adyuvante en la población del estudio de tag-SNPs frente al 48,9% en la población del estudio de exomas, así como el 52,2% de pacientes en tratamiento metastásico en la

población del estudio de tag-SNPs frente al 49,8% en la población del estudio de exomas. Además, en el periodo de tiempo en el que se incorporaron estos pacientes era frecuente, en el Hospital 12 de Octubre, que los tratamientos en adyuvancia en CCR fueran con capecitabina en monoterapia. Eso hizo que se pasara de 20,9% de tratamientos en monoterapia en la población del estudio de tag-SNPs a 22,3% en el estudio de exomas, así como de 79,1% de tratamientos en combinación en la población de tag-SNPs frente a 77,7% en la de exomas. Dada la posible influencia de ligeras diferencias en la práctica clínica entre hospitales, se incluyó también el hospital de referencia como variable de confusión. Sin embargo, no se reveló ninguna asociación estadísticamente significativa independiente entre estas variables de confusión, sexo y hospital de procedencia, y reacciones adversas severas.

En cuanto al análisis de toxicidad en la población de estudio se observó que 2 de las 3 reacciones adversas severas observadas con mayor frecuencia fueron síndrome mano-pie y diarrea, las cuales han sido descritas como las principales para este fármaco. La frecuencia de las mismas fue similar a la obtenida en otros estudios encontrados en la literatura (3-10% y 10-25%, respectivamente)^{162,232-235}.

Tal y como se establece en los objetivos de esta memoria se emplearon 2 técnicas diferentes en la búsqueda de variantes genéticas asociadas a reacciones adversas. Estas técnicas, hasta ahora escasamente empleadas en la farmacogenética de las reacciones adversas a fluoropirimidinas directamente en pacientes, fueron la selección de tag-SNPs y la secuenciación de exomas.

La técnica de selección de tag-SNPs resultó exitosa en la identificación de nuevos biomarcadores de riesgo de reacciones adversas graves a la capecitabina. Este hecho queda demostrado por la identificación de 10 SNPs, de los cuales sólo uno había sido previamente descrito en relación a toxicidad inducida por capecitabina, rs2072671 en *CDA*^{181,196}. Los resultados de este subestudio han sido publicados en la revista *Pharmacological Research* (Anexo 2)²³⁶.

La utilización de tag-SNPs ya había sido utilizada exitosamente en la investigación del riesgo o susceptibilidad de CCR^{132,134,136}. No obstante, en el estudio realizado por Wheeler y cols. se identificaron 10 tag-SNPs, uno de los cuales, el rs9936750, situado en

una región intergénica próxima a los genes *IRX6*, *CES1* y *MMP2*, fue asociado con síndrome mano-pie inducido por capecitabina²³⁷. A diferencia del abordaje realizado en esta memoria, Wheeler y cols., entre los que se encuentra el grupo del Laboratorio de Farmacogenética del Hospital Gregorio Marañón, analizaron los tag-SNPs seleccionados en líneas celulares y posteriormente confirmaron la asociación con toxicidad a capecitabina en un grupo de pacientes. Entre este grupo de pacientes se encuentra parte de la población de estudio de esta memoria.

Entre las limitaciones del presente estudio se encuentra la técnica de selección en sí misma que, de por sí, excluye otros genes que indudablemente podrían estar asociados a toxicidad en la población estudiada, como podría ser el caso de *MTHFR*¹⁸⁶, así como polimorfismos localizados en otras regiones no consideradas, como aquéllos localizados en intrones, regiones consideradas tradicionalmente sin importancia pero recientemente descritas en la regulación de la expresión de ciertos genes^{238,239}. Los propios criterios de selección, como por ejemplo el considerar únicamente tag-SNPs con una frecuencia alélica superior a 0,05, podrían hacer que se perdieran SNPs fuertemente relacionados con toxicidad a capecitabina. Sin embargo, variantes con frecuencias muy bajas dificultan su implantación en test farmacogenéticos porque hacen que la relación coste/efectividad se incremente enormemente.

La selección de los tag-SNPs, en este caso, se focalizó en los genes *CDA*, *CES1*, *DPYD*, *ENOSF1*, *SLC22A7*, *TYMP*, *TYMS* y *UMPS*. El presupuesto, las limitaciones técnicas y el número de pacientes analizado hicieron que se seleccionaran solo estos genes. Evidentemente, es un grupo pequeño de genes en relación a todos los que participan en la ruta de las fluoropirimidinas, pero el carácter exploratorio de la técnica para la identificación de SNPs asociados a toxicidad a capecitabina, justifica este estudio inicial. Por otro lado, y lamentablemente, la herramienta web SYSNPs no está accesible actualmente por lo que los resultados de la selección de SNPs no son verificables. Estos tag-SNPs seleccionados cubrían la región codificante, más interesante *a priori*, pero no se han analizado los SNPs correlacionados con las variantes seleccionadas. Esto será objeto de estudio futuro. Así, sería interesante analizar los SNPs en desequilibrio de ligamiento con los asociados a toxicidad severa en este estudio, rs532545 y rs471760 en *CDA* y rs15872, rs2847150, rs1051527, rs2853528, rs2853532 y rs2612100 en *TYMS*. El

análisis de estos SNPs correlacionados supondría el verdadero fundamento de los tag-SNPs con el fin de identificar las verdaderas variantes causantes de la toxicidad²⁴⁰.

Para minimizar la limitación del número elevado de asociaciones analizadas en la estadística se utilizó la corrección por FDR. Este método de corrección es ampliamente aceptado por la comunidad científica²⁴¹.

Por todas estas limitaciones, los datos obtenidos en esta memoria son insuficientes para identificar la totalidad de pacientes con riesgo elevado de reacciones adversas graves con un alto grado de certeza y explicar la toxicidad de los mismos, poniendo de manifiesto la necesidad de búsqueda de marcadores adicionales. Sin embargo, se considera que, incluso con estas limitaciones, los SNPs identificados son relevantes y sería de interés incluirlos en futuros análisis con el fin de ser validados.

Por su parte, la secuenciación de exomas, nos permitió obtener por primera vez según nuestro conocimiento, un perfil global de todas las variantes en genes conocidos por participar en la farmacocinética y farmacodinamia de las fluoropirimidinas en pacientes que habían experimentado toxicidad severa tras el tratamiento con regímenes basados en capecitabina. Los resultados de este subestudio han sido publicados en la revista *Pharmacogenomics* (Anexo 3)²⁴². Esta estrategia no reveló ninguna nueva variante relacionada con toxicidad a capecitabina. Sin embargo, resultó ser exitosa para encontrar claras asociaciones en variantes en *DPYD* y *MTHFR* con toxicidad global y retraso de dosis debido a toxicidad, respectivamente. Esto sugiere que la secuenciación de exomas podría ser útil en la identificación de nuevos biomarcadores para la predicción de toxicidad inducida por fluoropirimidinas en estudios con una población mayor a la utilizada en este trabajo.

En farmacogenética, la secuenciación masiva ha sido utilizada, por ejemplo, para proporcionar un mapa de distribución global de alelos CYP de importancia clínica poniendo de manifiesto la gran variabilidad genética entre las principales poblaciones²⁴³ o para identificar variantes en 231 genes relevantes en el metabolismo, transporte y eliminación de fármacos demostrando la utilidad de esta técnica en la obtención de perfiles personalizados farmacogenómicos²⁴⁴. En cuanto a la utilización de la secuenciación masiva en estudios de toxicidad a quimioterapia se han identificado

variantes asociadas a toxicidad de carboplatino y gemcitabina²⁴⁵. También han sido publicados estudios basados en el empleo de esta técnica en la investigación de CCR, que demuestran su aplicabilidad y mejora en la detección de mutaciones con adecuada sensibilidad y especificidad con respecto a las técnicas convencionales^{154,246,247}.

En este estudio se identificaron 3 nuevas variantes localizadas en regiones codificantes de *DPYD*, *GGH* y *UCK1*. Sin embargo, ninguna de ellas fue confirmada mediante secuenciación de Sanger, a pesar de que los parámetros de calidad en el proceso de la secuenciación de exomas fueron bastante buenos y ajustados a lo esperado. La secuenciación masiva, a pesar de su potencial, tiene limitaciones importantes. En comparación con la secuenciación clásica de Sanger, las secuencias individuales obtenidas en la secuenciación masiva son más cortas y contienen más errores pero el hecho de que cada base se encuentre representada en muchas secuencias hace que se pueda tener una buena certeza de la secuencia de millones de pares de bases¹⁵¹. Por otro lado, la NGS tiene menor sensibilidad para detectar mutaciones pero su rendimiento diagnóstico es mucho mayor debido a que se estudian todos los genes del genoma simultáneamente¹⁴⁸. Otra limitación de la NGS son las alteraciones debidas a secuencias repetidas, algunas de las cuales pueden ser de un tamaño mayor que los fragmentos secuenciados y, por lo tanto, no pueden ser alineadas correctamente²⁴⁸.

Por consiguiente, los 3 falsos positivos encontrados sugieren que debe extremarse la precaución en la interpretación de los resultados obtenidos con esta técnica. Asimismo, pone de manifiesto la importancia de validar dichos resultados y la necesidad de mejora en las técnicas de secuenciación masiva y de alineamiento. Esto está en consonancia con las conclusiones obtenidas por Ma y cols. que demostraron que la NGS permite detectar más variaciones que las técnicas convencionales pero que es necesario estudiar el valor clínico de estas variantes adicionales identificadas²⁴⁶. Por su parte, Serrati y cols también apuntaron en su revisión de la utilidad de la NGS en diferentes tumores sólidos y hematológicos que, aunque los resultados iniciales demuestran que la NGS puede mejorar la atención al paciente, guiándolos hacia terapias más dirigidas, aún su utilidad clínica y eficacia debe ser evaluada en sucesivos estudios²⁴⁹.

Por otra parte, el presente estudio se focalizó en los genes candidatos con un papel conocido en la farmacocinética y farmacodinamia de las fluoropirimidinas, ya que se

consideró que estos genes podrían ser aquéllos con mayor potencial para influir en la toxicidad a capecitabina. Sin embargo, otras alteraciones en la secuencia de genes adicionales que no fueron estudiados en el presente trabajo, el posible efecto cooperativo entre algunas variantes en genes de diferentes vías o mecanismos de toxicidad alternativos (por ejemplo, a nivel de la regulación post-transcripcional, regulación de la transcripción por metilación o por micro ARNs) también podrían influir en las reacciones adversas y explicar la alta frecuencia y gravedad de la toxicidad de estos tratamientos^{250,251}. Todos estos abordajes podrían ser empleados en un futuro para mejorar los test de predicción de riesgo de toxicidad severa a capecitabina.

Asimismo, el actual conocimiento insuficiente sobre la funcionalidad de muchas de las variantes genéticas implicadas en esta ruta nos impide asignar con precisión un riesgo de toxicidad. Aunque este análisis reveló 17 SNPs en secuencias exónicas codificantes, estos resultados no explican completamente la toxicidad observada en los 8 pacientes seleccionados en el estudio, dado que, por ejemplo, los pacientes 2 y 5 (Tabla 28) no tenían ninguno de los 5 SNPs considerados como dañinos o potencialmente dañinos, pero, sin embargo, experimentaron toxicidad severa.

Otra limitación del estudio de exomas en particular es el pequeño tamaño muestral, dado el carácter exploratorio del mismo, de tan sólo 8 pacientes con CCR tratados con capecitabina en comparación con otros estudios^{154,247}. No obstante, aunque el tamaño muestral pudiera ser limitado, la NGS permitió validar 2 asociaciones entre polimorfismos y toxicidad a fluoropirimidinas, previamente descritas.

Debido a que no se logró identificar ninguna variación genética no descrita previamente mediante esta técnica, el principal beneficio derivado de la secuenciación de exomas ha sido obtener información sobre la totalidad de las variantes genéticas en toda la secuencia codificante, y poder confirmar asociaciones con toxicidad, previamente descritas por otros autores. Los hallazgos preliminares presentados, de ser validados en una población mayor de pacientes, podrían ser de gran ayuda en la indicación de tratamientos basados en capecitabina en base a la presencia de determinadas variantes genéticas.

En esta memoria, aunque se ha realizado la secuenciación completa de los exomas, el análisis final se centró en un panel de genes, aquellos que intervienen o se han relacionado con la ruta de las fluoropirimidinas. En este sentido, la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva a paneles de genes, en lugar de exomas completos, podría ser interesante ya que permitiría reducir el coste de la técnica, mejorando el ratio coste/efectividad y reduciendo la complejidad asociada al análisis de los resultados.

En el caso de la toxicidad a fluoropirimidinas, y dado el papel tan relevante de *DPYD* en la toxicidad, se ha propuesto la secuenciación únicamente de los 23 exones de este gen para identificar las variantes en pacientes con una elevada toxicidad^{174,252,253}. De hecho, la secuenciación completa de *DPYD* por la técnica de Sanger está siendo utilizada de manera rutinaria en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Hospital Gregorio Marañón en pacientes con elevada toxicidad a fluoropirimidinas negativos para las 3 variantes cuya determinación está recomendada (rs3918290, rs55886062 y rs67376798). De esta manera, se ha podido descubrir una nueva variante en *DPYD*, no descrita previamente, en una paciente y que es la causa de la pérdida del exón 19 en la transcripción del gen generándose una proteína no funcional (datos no mostrados, García-González X y cols. enviado). Sin embargo, esta aproximación se utiliza en pocos sitios y será sustituida, sin duda en un futuro cercano, por la secuenciación masiva debido al abaratamiento de costes esperado para esta técnica en los próximos años²⁵⁴. En la actualidad secuenciar sólo los exones de *DPYD* supone un coste de aproximadamente 250€ (Hospital General Universitario Gregorio Marañón) frente al coste de secuenciar un exoma completo que oscila en torno a 400-600€ o un panel de genes en secuenciación masiva (entre 200-350€, dependiendo del número de muestras y genes).

Las posibles implicaciones de las variantes identificadas asociadas significativamente a efectos adversos en los 2 estudios llevados a cabo se discuten a continuación agrupadas por gen con el fin de adquirir una visión global de cada gen asociado a toxicidad.

Dichas asociaciones, identificadas por ambas aproximaciones, podrían contribuir a una mejora en la calidad de vida de los pacientes y al sostenimiento de los sistemas de salud

mediante la mejora en el uso eficiente de las alternativas disponibles, reduciendo los costes asociados a los efectos adversos graves. No obstante, necesitan ser validadas en cohortes mayores antes de poder ser plenamente útiles en la selección de pacientes de bajo riesgo de toxicidad al tratamiento con capecitabina y, consecuentemente, en la exclusión de aquéllos en los cuales la toxicidad asociada no justifica el fin terapéutico.

5.1.- Dihidropirimidina deshidrogenasa

La DPYD es una enzima crucial en la ruta de las fluoropirimidinas y tiene un papel fundamental en el metabolismo del 5-FU, de manera que los pacientes con una deficiencia sistémica de DPYD tienen una capacidad reducida de degradación del mismo y por lo tanto son candidatos a desarrollar toxicidad asociada^{196,255,256}. Ciccolini y cols. estimaron que más del 60% de los casos de toxicidad a 5-FU podrían estar relacionados con una función alterada de DPYD²⁵⁷. Así, la deficiencia enzimática de DPYD ha sido considerada durante décadas la principal causa de toxicidad severa y letal asociada a fluoropirimidinas y se ha reconocido como un importante factor farmacogenético.

Las variaciones genéticas más comunes, cuya asociación entre la incidencia de toxicidad por fluoropirimidinas y su presencia ha sido claramente documentada, son *DPYD**2A (rs3918290), *DPYD**13 (rs55886062) y c.2846A>T (rs67376798). En el estudio más amplio hasta la fecha realizado en 2.886 pacientes tratados con quimioterapia adyuvante basada en FOLFOX o FOLFIRI con o sin cetuximab, *DPYD**2A y rs67376798 fueron asociados estadísticamente a toxicidad de grado superior a 3¹⁷¹, hallazgos confirmados en otros trabajos y meta-análisis¹⁸¹. No obstante, recientes estudios han demostrado que multitud de pacientes que no presentaban dichas variantes, mostraban una actividad enzimática reducida¹⁶⁹.

En el presente trabajo, todos los pacientes incluidos tenían previamente genotipadas estas 3 variantes en *DPYD* (datos no mostrados), pero la frecuencia de las mismas era tan baja que no explicaba la toxicidad de la mayoría de los pacientes que la sufrían, lo que justificaba el estudio de posibles variantes genéticas diferentes que pudieran estar contribuyendo a la toxicidad. Además, los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado eran negativos para dichos polimorfismos, lo que implica que la probabilidad de encontrarlos

era nula, hecho que sí podría ocurrir si los pacientes se hubieran seleccionado de un modo completamente ciego.

Varios fueron los polimorfismos en *DPYD* analizados en los dos estudios realizados en esta memoria. De los 5 SNPs analizados en *DPYD* en el estudio de tag-SNPs, sólo rs12119882 resultó asociado a una reacción adversa severa, en este caso toxicidad hepática medida por los niveles de bilirrubina (Tabla 21). Los 5 SNPs analizados se localizaron en regiones 3'UTR y en regiones *downstream*. Este polimorfismo, rs12119882, localizado en la región *downstream* del gen, no había sido previamente asociado a toxicidad por fluoropirimidinas. Sin embargo, lo presentan entre el 2 y el 17% de la población europea siendo la frecuencia más alta de todas, la observada en el País Vasco²⁵⁸. La relativamente alta frecuencia de este SNP en población española comparado con la mayoría de SNPs en *DPYD* y fundamentalmente con aquellos cuyo genotipo está recomendado analizar, hace que sea un candidato extraordinario para validar en futuros estudios y analizar su contribución al poder predictor del riesgo de toxicidad severa.

En el estudio de exomas 5 SNPs no sinónimos fueron identificados en *DPYD* en los 8 pacientes (rs1801158 p.Ser534Asn, rs1801159 p.Ile543Val, rs1801265 p.Cys29Arg, rs1801160 p.Val732Ile y rs2297595 p.Met166Val) (Tabla 29). De ellos, 3 fueron considerados como dañinos o probablemente dañinos por PolyPhen-2 o SIFT (rs1801158, rs1801160 y rs2297595), mientras que los otros 2 fueron catalogados como sin efecto sobre la funcionalidad de la proteína (rs1801159 y rs1801265). De los 3 SNPs que fueron analizados por ser potencialmente dañinos sólo el rs1801160 resultó asociado significativamente a riesgo de toxicidad global.

En la literatura estas variantes han sido estudiadas en otros estudios con resultados muy dispares. Así, el resultado de este trabajo para la variante rs1801160 (c.2194G>A) se encuentra en línea con los hallazgos previos de asociaciones entre este SNP y reacciones adversas severas tras el tratamiento con regímenes basados en 5-FU en CCR^{162,259}. Esto ha sido confirmado muy recientemente, en un análisis con 10 SNPs en *DPYD*, el cual reveló que los pacientes tratados con fluoropirimidinas portadores de la variante A para el polimorfismo rs1801160 tenían mayor probabilidad de sufrir reacciones adversas, especialmente neutropenia, y un menor tiempo transcurrido desde la primera dosis a la

aparición del efecto adverso severo^{260,261}. Sin embargo, otros estudios sostienen la no relación de este polimorfismo con toxicidad a fluoropirimidinas¹⁷⁵.

Con respecto a los otros dos polimorfismos analizados, rs2297595 y rs1801158, los resultados son igualmente contradictorios. Algún estudio relaciona, entre otros, el SNP rs2297595 con reacciones adversas severas a fluoropirimidinas²⁶⁰, mientras que otros incluso le adjudican un carácter protector de la toxicidad asociada a fluoropirimidinas²⁵⁹. Lo mismo ocurre con el polimorfismo rs1801158, aunque en este caso es mayoritaria la no relación con la toxicidad inducida por fluoropirimidinas^{162,175,259,262}. Algunos autores sugieren, sin embargo, que estos SNPs podrían ser interesantes para predecir toxicidad frente a fluoropirimidinas en una variedad de cánceres debido a su asociación documentada en cáncer gastroesofágico y cáncer de mama¹⁷².

Los resultados presentados en esta memoria, por tanto, aportan evidencias de la asociación del SNP rs1801160 con toxicidad a tratamientos basados en capecitabina, pero no de los SNPs rs2297595 o rs1801158 y aportan un valor que tendrá que ser evaluado posteriormente mediante meta-análisis que tengan en cuenta todos los trabajos.

Estos resultados controvertidos sobre la asociación entre estas variantes y la toxicidad inducida por fluoropirimidinas podrían deberse al papel individual mínimo de cada variante en la disminución de la actividad de *DPYD*, suponiendo un efecto aditivo cuando varias de ellas están presentes simultáneamente y explicando, de este modo, la toxicidad encontrada en algunos pacientes. En este sentido, se decidió analizar el posible efecto acumulativo de las variantes en *DPYD* localizadas en regiones codificantes en las reacciones adversas severas observadas en la cohorte de 319 pacientes. Esta aproximación no es del todo nueva ya que Gentile y cols. ya han mostrado cómo un haplotipo con 3 variantes en *DPYD*, denominado hap7 (rs1801160 c.2194G>A, rs1801265 c.85C>T y rs2297595 c.496A>G) causa una disminución de la actividad de *DPYD* similar a la causada por el alelo *DPYD**2A, cuyo genotipado está recomendado para prevenir toxicidad severa a fluoropirimidinas²⁶³. La frecuencia de prescripción de GCSF, toxicidad hepática y global, síndrome mano-pie, astenia y retraso en el tratamiento, reducción de dosis o retirada de capecitabina por toxicidad fue superior en pacientes con una puntuación de 4 o mayor en el algoritmo creado para los 5 SNPs de

DPYD que fueron analizados, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 33). Sin embargo, este dato puede ser revelador y justifica que se hagan nuevos estudios incluyendo un mayor número pacientes, seleccionando determinados SNPs en *DPYD* o asignando valores diferentes en función de la actividad estimada de la proteína.

Varias fueron las limitaciones en el análisis de las variantes de *DPYD*, que por otra parte, pueden ser aplicables al resto de genes. Por un lado, la administración de oxaliplatino junto a la capecitabina fue analizada como covariable de confusión en la asociación del SNP rs1801160 con toxicidad global. Esta covariable fue estadísticamente significativa, lo cual es lógico ya que se ha documentado que el oxaliplatino contribuye a incrementar la severidad de algunas reacciones adversas, por ejemplo neuropatía y fatiga²⁶⁴. No obstante, en el presente estudio, a pesar de las variables de confusión analizadas, la asociación entre el SNP rs1801160 en *DPYD* y toxicidad global fue independiente. Esto hace que un estudio del riesgo de toxicidad en pacientes con la variante rs1801160 tratados con la combinación de capecitabina y oxaliplatino tenga mucho sentido por su contribución independiente a la toxicidad. En resumen, la variante rs1801160 es un excelente candidato para ser validado mediante nuevos ensayos, idealmente clínicos, donde la terapia y la dosificación se hagan bajo criterios genotípicos y se compare con un brazo control, sin el uso de test genéticos.

5.2.- Timidilato sintasa

La timidilato sintasa es la principal diana del 5-FU (Figuras 4 y 5) y por este motivo ha sido ampliamente estudiada en farmacogenética en fluoropirimidinas. Varios son los polimorfismos descritos en este gen y que se ha descrito que pueden influir en la respuesta a fluoropirimidinas, aunque sin un consenso claro. Los más destacados son una repetición de 28 pares de bases en la región promotora y una delección de 6 pares de bases en la región 3'UTR^{265–267}.

En la presente memoria, con el fin de identificar nuevos marcadores de toxicidad, fueron 2 los tag-SNPs seleccionados en *TYMS* para estudiar su asociación con reacciones adversas severas, rs2853741 y rs699517, localizados en regiones *upstream* y 3'UTR,

respectivamente. Ambos resultaron asociados a reacciones adversas severas, concretamente a diarrea en el caso del SNP rs2853741 y a náuseas/vómitos, pérdida de peso/anorexia y astenia en el caso del SNP rs699517 (Tabla 21).

En base a nuestro conocimiento, es la primera vez que la variante rs2853741 es estudiada y que, en consecuencia, es asociada a toxicidad por quimioterapia. En este caso, la variante C para el polimorfismo rs2853741 resultó protectora frente a diarrea severa. Al localizarse este SNP en la región *upstream* del gen, este efecto puede ser debido a que altere alguna secuencia de unión a un factor de transcripción, aumentando la misma, o bien a que este tag-SNP no sea el causal y sí algún SNP en desequilibrio de ligamiento. Este punto deberá ser dilucidado en futuros estudios.

Por su parte, la variante rs699517 únicamente ha sido estudiada en relación a susceptibilidad a cáncer gástrico y pulmonar sin hallazgos significativos^{268,269}. Así, la variante T resultó ser un factor pronóstico de aumento del riesgo de sufrir náuseas/vómitos severos y de pérdida de peso/anorexia severa en pacientes con CCR en tratamiento con capecitabina. Por otro lado, la misma variación se mostró asociada a una menor probabilidad de sufrir astenia severa. Estos resultados, aparentemente contradictorios, en los que una misma variante es favorecedora de riesgo sobre unos efectos adversos y protectora sobre otros, ya han sido observados por el grupo de investigación del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Hospital Gregorio Marañón en el polimorfismo rs34489327¹⁹⁷. En ese estudio, los portadores de la delección de 6 pares de bases en la región 3'UTR de *TYMS* tenían una mayor probabilidad de náuseas y vómitos severos (15%) que los portadores de la inserción (1,9%), mientras que los portadores de la delección tenían un menor riesgo de sufrir síndrome mano-pie o astenia que los portadores de la inserción. Los datos sugieren que los mecanismos de aparición de náuseas/vómitos asociados a capecitabina son diferentes a los de otras toxicidades. Esta aparente contradicción también podría ser explicada por sesgos metodológicos, por ejemplo, debido al elevado número de combinaciones entre efectos adversos y genotipos. Sin embargo, en esta memoria, el ajuste realizado tanto con variables de confusión como por el FDR, utilizado en estudios con muchas variables, minimiza que esto sea lo que está ocurriendo²⁷⁰. Por otra parte, esto también puede ser debido a que el SNP causal sea realmente otro o bien sea un

haplotipo o combinación de SNPs que incluya este SNP entre otros²⁷¹. Por otro lado, las limitaciones propias del estudio, como el tamaño muestral o las diferentes combinaciones de tratamientos podrían influir en este resultado. En cualquier caso, el resultado obtenido es suficientemente robusto como para justificar el estudio de estos 2 nuevos SNPs, o bien SNPs en desequilibrio de ligamiento con ellos, en futuras investigaciones.

En el estudio de identificación de polimorfismos genéticos mediante secuenciación masiva de exomas no se identificó ninguna variación en el gen *TYMS* en ninguno de los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado. Esto es lógico dada la pequeña muestra que se utilizó en esta aproximación experimental y las pequeñas frecuencias de variación genética en este gen en región codificante, debido al importante papel del mismo en la síntesis de ADN, y por lo tanto en la supervivencia y proliferación celular, así como en el metabolismo de folato²⁷².

Por lo tanto, estos resultados abren nuevas vías de estudio de marcadores en *TYMS* asociados a toxicidad inducida por fluoropirimidinas.

5.3.- Metilentetrahidrofolato reductasa

La enzima MTHFR es clave en el metabolismo del ácido fólico participando en la homeostasis y en la regulación del folato intracelular, esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos²⁷³. Los polimorfismos más frecuentes y estudiados en *MTHFR* son C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131). Una de estas variantes, calificada además como dañina o potencialmente dañina por SIFT y PolyPhen, la rs1801133, cambia una alanina por una valina en la posición 222 de *MTHFR*, y fue identificada en 6 pacientes de los que se secuenció su exoma (Tabla 28). Este SNP fue asociado estadísticamente a retraso en la administración de sucesivas dosis de capecitabina debido a toxicidad en esta memoria, lo que constituye uno de los dos hallazgos más robustos obtenidos. Esta asociación estadísticamente significativa fue independiente de las variables de confusión, entre las cuales se encontraba la administración concomitante de otros fármacos, entre ellos el oxaliplatino, el cual también se asoció a retraso en la administración. Esta asociación, al igual que en la identificada entre el SNP

rs1801160 en *DPYD* y riesgo de toxicidad global, es esperada puesto que el oxaliplatino contribuye a incrementar la severidad de algunas toxicidades específicas²⁶⁴.

Los resultados del presente trabajo son consistentes con los publicados por otros autores, los cuales sugieren que el SNP rs1801133 podría estar asociado con toxicidad severa y con el resultado del tratamiento basado en fluoropirimidinas en pacientes con CCR^{274,275}. En el estudio de Glimelius y cols. fue el genotipo CC en rs1801133 el que se asoció a unas mayores tasas de toxicidad¹⁹². No obstante, otros autores sostienen que este mismo genotipo podría estar relacionado con un menor riesgo de toxicidad^{191,276}. Además, en un trabajo previo del grupo de investigación del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Hospital Gregorio Marañón, no se encontró asociación entre el polimorfismo rs1801133 y toxicidad en un subgrupo de los mismos pacientes analizados en la presente memoria, datos que también encontraron otros autores^{189,197}. En este caso, el incremento del tamaño de la muestra ha podido mejorar los análisis estadísticos. Este resultado aparentemente contradictorio en el que la única variación ha sido el tamaño muestral, en gran parte, puede explicar la enorme variabilidad de resultados encontrados en la literatura en relación a este SNP en concreto, y en general en farmacogenética sugiriendo que un tamaño muestral insuficiente conduce a asociaciones inexistentes.

Además de este SNP, rs1801133, otros 2 no sinónimos fueron identificados en *MTHFR* (rs2274976 p.Arg594Gln y rs35737219 p.Thr653Met), los cuales no tenían teóricamente efecto sobre la funcionalidad de la proteína. Sin embargo, al menos uno de ellos, el rs2274976, ha sido relacionado con respuesta a quimioterapia basada en 5-FU en pacientes chinos con cáncer gástrico, por lo que no podemos descartar un efecto también en la toxicidad y probablemente merecerá la pena estudiarlo en futuros proyectos²⁷⁷.

5.4.- Citidina deaminasa

La enzima CDA tiene un papel crucial en la conversión de capecitabina a 5-FU. Se han descrito varios polimorfismos en el gen *CDA* que se han asociado con variación en los

niveles de ARNm y por consiguiente en los niveles proteicos, y con toxicidad a medicamentos.

De los SNPs en *CDA* analizados en la presente memoria, el más estudiado, sin duda alguna, es el rs2072671, en el que una lisina es cambiada por una glicina en la posición 27 de *CDA*²²⁶. Este cambio hace que pacientes portadores de la variante muestren tasas reducidas de aclaramiento de gemcitabina, un fármaco metabolizado por *CDA*, y en consecuencia, una toxicidad más severa al mismo²⁷⁸. Este SNP no solo fue incluido en el estudio de tag-SNPs, sino que también fue identificado en el estudio de exomas.

La asociación de este SNP con toxicidad inducida por capecitabina ha sido claramente documentada^{195,197}. Así, su asociación con toxicidad global coincide con los resultados obtenidos por García-González y cols. en una subpoblación de la cohorte de pacientes utilizada en esta memoria. La confirmación en este trabajo refuerza el poder predictivo de esta variante en la prevención de reacciones adversas severas¹⁹⁷. El estudio de dicha variante en una población mayor de pacientes ha hecho posible identificar, además, la asociación de este SNP con riesgo elevado de síndrome mano-pie. En contraste con nuestros resultados, otros estudios no muestran una conexión entre este SNP y toxicidad inducida por fluoropirimidinas^{181,205}, lo que podría ser debido a diferencias en el diseño del estudio, tamaño muestral, los criterios para establecer un corte para las reacciones adversas severas o las variaciones en la medicación concomitante²⁷⁹.

El SNP rs2072671, como se ha comentado anteriormente, se identificó igualmente en el estudio de secuenciación de exomas (Tabla 29). Sin embargo, este polimorfismo no fue analizado en la población general por ser considerado como tolerado y benigno por SIFT y PolyPhen-2. No obstante, la variante A de este SNP se encontró presente en 5 pacientes homocigotos y en 3 heterocigotos de los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado, lo que podría explicar parte de la toxicidad observada en los mismos. Este hecho, unido a su elevada frecuencia en la población europea (46-88%), justificaría sin lugar a dudas su inclusión en futuros estudios para verificar su asociación a toxicidad y su implementación en clínica.

Por otra parte, los otros 2 tag-SNPs analizados también resultaron asociados a reacciones adversas severas (rs12726436 con retraso de dosis y rs1048977 con

hiperbilirrubinemia) (Tabla 21). El primero se localiza en la región 5'UTR y el segundo es un SNP sinónimo que no provoca un cambio de aminoácido. Ninguno de estos 2 tag-SNPs han sido estudiados hasta la fecha en profundidad y, de acuerdo a nuestro conocimiento, en ningún caso han sido relacionados con toxicidad inducida por quimioterapia²⁸⁰. En base a ello, por primera vez, estos SNPs han sido asociados en el presente a toxicidad por fluoropirimidinas lo que hace que sean buenos marcadores a incluir en futuros estudios para su validación en cohortes más grandes.

Cabe destacar que algunas variables de confusión también resultaron significativas en el análisis. Así las asociaciones de *CDA* rs12726436 con retraso de dosis y de *CDA* rs2072671 con toxicidad global se mantuvieron estadísticamente significativas aunque la administración de oxaliplatino y de bevacizumab fuera también significativa.

Finalmente, el SNP rs3215400, identificado en 7 de los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado, tampoco fue seleccionado para su estudio por no localizarse en zona de codificación para proteína. Sin embargo, este SNP se asocia a toxicidad inducida por fluoropirimidinas en algunos trabajos^{195,196}, por tanto, sería interesante evaluar su impacto en la toxicidad en futuros estudios.

5.5.- Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7

OAT2, codificado por el gen *SLC22A7*, es un transportador de aniones orgánicos hacia el interior de la célula cancerosa, responsable de parte de la captación del 5-FU (Figura 4)^{182,281}. De esta manera, las variantes genéticas correlacionadas con un aumento de OAT2 podrían conducir a un transporte más marcado de este fármaco hacia el interior celular y podrían explicar el aumento de la toxicidad asociada.

En la presente memoria, fueron 4 los tag-SNPs en *SLC22A7* seleccionados para el estudio de su asociación con reacciones adversas, rs17209379, rs1574430, rs2270860 y rs4149178, localizados en regiones *upstream*, *downstream*, codificante sinónima y 3'UTR, respectivamente. De estos 4 SNPs, 2 resultaron asociados a reacciones adversas severas, rs2270860 con riesgo de toxicidad cutánea y rs4149178 con diarrea (Tabla 21). Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describen asociaciones entre

ciertas variantes en *SLC22A7* y reacciones adversas a tratamientos basados en capecitabina, lo que supone un hallazgo relevante. No obstante, aunque la variante rs4149178 no se ha encontrado descrita previamente en relación a toxicidad inducida por fluoropirimidinas, sí ha sido asociada con anterioridad a cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en niños²⁸². Esto puede sugerir que la zona 3'UTR donde se localiza esta variante puede ser de relevancia en la regulación post-transcripcional²⁸³.

Cabe destacar que, en el caso de la asociación entre la variante rs4149178 y riesgo de diarrea, dicha reacción adversa fue también asociada estadísticamente a la administración de irinotecan como fármaco concomitante. No obstante, en el presente estudio, el análisis estadístico multivariante considerando la posible contribución de los fármacos quimioterápicos concomitantes, mostró una asociación independiente entre el SNP rs4149178 en *SLC22A7* y diarrea severa.

La identificación de 2 nuevas variantes en *SLC22A7* es de gran relevancia en el marco de biomarcadores predictivos de toxicidad dado que el 36% de los tumores de CCR sobreexpresan OAT2, un hallazgo que se ha asociado con una respuesta tumoral objetiva a la quimioterapia basada en fluoropirimidinas²⁸⁴.

En el estudio de identificación de polimorfismos genéticos mediante secuenciación masiva de exomas no se identificó ninguna variación no sinónima en el gen *SLC22A7* en ninguno de los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado. Por este motivo, ninguno de los 3 polimorfismos identificados en los 8 pacientes se tuvo en cuenta en el análisis. No obstante, uno de ellos, rs2242416 localizado en región *downstream*, se encontró presente en 7 pacientes, lo que sería podría ser interesante analizar más en detalle, a pesar de que no se ha encontrado bibliografía en relación a este SNP.

5.6.- Uridina monofosfato sintetasa

La enzima UMPS constituye una de las enzimas responsables del metabolismo del 5-FU lo que permite alcanzar compuestos activos en células tumorales de forma directa, desempeñando un papel fundamental en los efectos citotóxicos de este fármaco (Figura 4)^{46,51}. El gen que codifica para esta enzima, aunque con resultados discordantes, ha sido

uno de los más estudiados dentro de las vías de activación del 5-FU y ciertas variantes en este gen han sido asociadas a resistencia farmacológica adquirida en algunas líneas celulares cancerosas^{206,285}. Se ha documentado que la disrupción del gen *UMPS* podría constituir un importante factor de baja respuesta a 5-FU²⁰⁶. Por el contrario, una actividad incrementada de la enzima podría ligarse a una mayor toxicidad asociada a este fármaco^{144,180,286}.

Dos de los cinco SNPs estudiados en el análisis de tag-SNPs, rs2279199 y rs4678145, resultaron asociados por primera vez a toxicidad inducida por capecitabina, concretamente a náuseas/vómitos y astenia, respectivamente (Tabla 21). Estos hallazgos son de gran relevancia y abren, al igual que ocurre con *SLC22A7* el abanico de posibles genes con variantes que son interesantes de estudiar en futuros trabajos en relación a riesgo de toxicidad inducida por fluoropirimidinas.

Asimismo, aunque no se seleccionó ninguna variante en *UMPS* en el estudio de exomas por no encontrarse ninguna de ellas en regiones codificantes no sinónimas, la variante *UMPS* rs2279199 se encontró presente en 5 de los 8 pacientes cuyo exoma fue secuenciado, por lo que podría ser interesante analizar si su presencia podría estar contribuyendo en parte a la toxicidad observada en estos pacientes.

Los estudios farmacogenéticos tienen limitaciones que merecen ser comentadas y que son las responsables en gran medida de la falta de reproducibilidad en los estudios de toxicidad, lo que hace difícil la identificación y validación de biomarcadores farmacogenéticos²⁷⁹. A ello contribuyen los distintos criterios utilizados en los diferentes estudios en cuanto a la gradación de efectos adversos (CTCAE⁸¹, Organización Mundial de la Salud²⁸⁷), los diferentes límites para considerar toxicidad severa (>1^{189,216}, >2¹⁵⁵ o >3²⁸⁸), la existencia de variables de confusión con potencial para influir en la toxicidad, principalmente fármacos concomitantes, y la diversidad de efectos adversos considerados.

Por su parte, las reducciones o retrasos de dosis no necesariamente se deciden exclusivamente ante una toxicidad severa; sino que el oncólogo puede inclinarse por

estas decisiones ante toxicidades moderadas persistentes en el tiempo o que afectan de forma considerable a la calidad de vida del paciente²⁸⁹. Este hecho también complica enormemente la evaluación de los resultados de toxicidad y farmacogenética y supone una limitación de los estudios en general y de éste en particular, ya que algunos pacientes hubieran alcanzado probablemente toxicidad severa de haber continuado con el tratamiento inicial.

La toxicidad global es el parámetro de toxicidad más útil clínicamente hablando. Sin embargo, en muchos de los análisis estudiados y, en base a nuestra experiencia, un SNP puede ser protector frente a una reacción adversa en concreto y de riesgo para otra, haciendo que al analizar la toxicidad global un dato anule al otro. Además, toxicidades diferentes pueden ser mecánicamente distintas y estar asociadas con variantes genéticas en diferentes genes, tal y como se ha discutido anteriormente. Esta es una limitación de la presente memoria que debería ser analizada en profundidad en cohortes más grandes.

Otra limitación de los estudios farmacogenéticos de toxicidad a estos fármacos es que, a veces, se consideran indistintamente pacientes tratados con 5-FU y capecitabina, fluropirimidinas con perfil de toxicidad ligeramente distinto, con lo que pierden información relevante para la asociación de toxicidad con el fármaco específico¹⁴⁴.

Para salvar algunas de las limitaciones propias de los estudios farmacogenéticos, que se acaban de comentar, se decidió normalizar la gradación de efectos adversos en base a los criterios CTCAE y considerar como límite de toxicidad severa aquéllas reacciones adversas de grado >2, criterios ya utilizados en estudios previos⁸³. Este límite fue el elegido puesto que, a partir del mismo, es más probable que la práctica clínica habitual empiece a alterarse en cuanto a modificaciones de dosis, retrasos en la administración o retiradas de tratamiento. Para salvar la limitación de los fármacos concomitantes, que pudieran distorsionar los resultados de toxicidad debido a reacciones adversas específicas, se incluyeron éstos como variables de confusión en el análisis de asociación multivariante.

Asimismo, se evitó incluir a pacientes que no tuvieran un estado aceptable, por lo que se incluyó como criterio de inclusión una puntuación ECOG menor o igual a 2. La escala

ECOG, aunque es un poco subjetiva, permite unificar criterios en la medida de cómo la enfermedad afecta a la calidad de vida diaria de los pacientes²⁹⁰. Cabría esperar que, en pacientes con peor estado funcional fuera más complicado evaluar la toxicidad, debido a que podría verse distorsionada por la situación clínica del paciente, hecho por el cual se consideró el límite ECOG previamente mencionado.

Los resultados obtenidos en la presente memoria aportan, por tanto, nuevos biomarcadores que contribuyen a paliar la necesidad de mejorar el poder predictivo de los test farmacogenéticos actuales así como la necesidad de la realización de estudios que profundicen en la prevención de reacciones adversas, que diariamente afectan a las tasas de efectividad de los tratamientos con fluoropirimidinas y a la calidad de vida de numerosos pacientes.

En definitiva, los resultados permiten ampliar el abanico de posibles variantes genéticas con influencia en el riesgo individual a sufrir reacciones adversas severas durante un tratamiento basado en capecitabina. La mayor parte de estas nuevas asociaciones pueden ser extrapoladas al tratamiento con 5-FU, excepto CDA y otras enzimas participantes en la conversión de capecitabina a 5-FU, aunque lógicamente, este punto necesita ser confirmado en poblaciones de pacientes tratadas bajo regímenes que contengan 5-FU.

En los estudios de farmacogenética en general, y en particular en el caso de las fluoropirimidinas hay resultados discrepantes para una gran mayoría de SNPs. Este trabajo es importante porque contribuye a alimentar una de las versiones cuando hay controversia, y por lo tanto es importante porque sustentará meta-análisis en el futuro que ayuden a predecir el riesgo de toxicidad y a validar biomarcadores farmacogenéticos.

En aquellas asociaciones que se han identificado en este trabajo y que coinciden con lo que recientemente se ha publicado en la literatura, como el *DPYD**6, parece evidente que hay que incrementar el nivel de evidencia que se les da en grupos de trabajo como el CPIC (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) y valorar su inclusión en las guías clínicas existentes en farmacogenética. Para ello, hay que replicar estos

resultados en otras poblaciones y, sobre todo, hacer ensayos clínicos que validen su inclusión en los test genéticos existentes.

El estudio de los tag-SNPs ha permitido comprobar cómo ésta es una buena herramienta para identificar nuevos SNPs asociados a toxicidad a capecitabina. Aunque muchos de los SNPs que han resultado asociados a toxicidad a capecitabina se corresponden con cambios en la secuencia de la proteína, dado que se ha priorizado eso en la selección de los mismos, será necesario evaluar los SNPs que se encuentren en desequilibrio de ligamiento e identificar los SNP causales.

El estudio de exomas ha permitido obtener el perfil genético completo de lo que sabemos a día de hoy de la ruta de fluoropirimidinas. Los resultados obtenidos sugieren que, por un lado, tiene que haber más genes implicados en esta ruta, puesto que no todos los pacientes tienen variantes que ayuden a explicar la toxicidad observada. Por otro lado, sabemos que la secuenciación masiva es el futuro y que el *big data* asociado será de gran ayuda para elucidar ésta y muchas otras cuestiones. Mientras esta tecnología, a nivel de exomas o genomas, no se generalice en los sistemas de salud, los paneles de genes pueden ser una solución temporal que permita avanzar en la identificación de nuevas variantes importantes.

Finalmente, el efecto aditivo de un grupo de variantes con escaso impacto cada una de manera independiente no queda demostrado en este trabajo, pero la tendencia observada en el estudio de las 5 variantes de *DPYD* hace ser optimista en que esta forma de explicar toxicidades, hasta ahora sin explicación, pueda ser una realidad en un futuro cercano y que merezca la pena explorarla en futuros estudios.

Este trabajo contribuye al desarrollo de herramientas que permitan la identificación de pacientes con peor respuesta o mayor riesgo de sufrir efectos adversos al tratamiento quimioterápico, lo cual es esencial para mejorar y optimizar las terapias que reciben los pacientes con CCR.

La caracterización de pacientes con una mayor predisposición genética para experimentar toxicidad permite individualizar los tratamientos y, en consecuencia, mejorar la calidad de vida, ahorrar costes e, indirectamente, aumentar la efectividad al evitar reducciones o retrasos dosis y suspensiones de tratamiento. Esta caracterización

de pacientes y poder predecir cuáles van a responder a la terapia o desarrollarán efectos adversos severos continúa siendo uno de los principales retos de la investigación en farmacogenética del CCR.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1. El uso de tag-SNPs es una estrategia útil para encontrar nuevos polimorfismos asociados con toxicidad severa a capecitabina en genes candidatos. Los polimorfismos rs12726436, rs2072671 y rs1048977 en el gen *CDA*, rs12119882 en el gen *DPYD*, rs2270860 y rs4149178 en el gen *SLC22A7*, rs2853741 y rs699517 en el gen *TYMS* y rs2279199 y rs4678145 en el gen *UMPS* son biomarcadores de toxicidad severa al tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina en pacientes con CCR. Los polimorfismos rs12726436, rs1048977, rs12119882, rs2270860, rs4149178, rs2853741, rs699517, rs2279199 y rs4678145 fueron descritos por primera vez en esta memoria en relación a toxicidad inducida por fluoropirimidinas, en concreto por capecitabina. Todos estos potenciales biomarcadores de toxicidad a capecitabina deben evaluarse en una población mayor de pacientes con CCR antes de ser aplicados en la práctica clínica.

2. El análisis de las variantes genéticas en genes de la ruta de fluoropirimidinas mediante la secuenciación de exomas es una técnica válida para identificar SNPs asociados a toxicidad inducida por capecitabina. La secuenciación masiva de exomas permitió validar 2 biomarcadores específicos, previamente descritos aunque con discrepancias en la literatura, asociados al riesgo de toxicidad a capecitabina en los genes *DPYD* y *MTHFR*. No se identificó ningún nuevo polimorfismo en genes de la ruta de las fluoropirimidinas, probablemente debido al bajo tamaño muestral de 8 exomas de pacientes secuenciados.

3. Conocer toda la secuencia codificante de los genes de la ruta de las fluoropirimidinas permite tener una visión global de la genética del paciente y de cómo responde éste al tratamiento. Sin embargo, esta visión es insuficiente dado que hay pacientes donde la toxicidad observada no puede ser explicada. Se hace necesario ampliar la secuenciación a zonas reguladoras e intrones, así como avanzar en el conocimiento de los genes humanos implicados en el metabolismo, transporte y eliminación de la capecitabina.

4. A pesar de la tremenda capacidad de generar datos en la secuenciación de exomas, las limitaciones y errores de la técnica hacen imprescindible la validación de los polimorfismos obtenidos mediante el uso de otra tecnología, principalmente si éstos

son descritos por vez primera vez, tal y como se pudo comprobar con los 3 supuestos nuevos SNPs en *DPYD*, *GGH* y *UCK1* en los pacientes cuyo exoma fue secuenciado.

5. La toxicidad a capecitabina requiere de un análisis complejo y muy pocos casos pueden ser explicados por una única variante genética. La creación de algoritmos que incluyan el sumatorio de pequeños efectos inducidos por cada variante puede ayudar a incrementar los valores predictivos de riesgo de toxicidad. Así, el análisis del efecto acumulativo de las 5 variantes en *DPYD* estudiadas en regiones codificantes reveló una correlación positiva entre la prescripción de GCSF, toxicidad hepática y global, síndrome mano-pie, astenia y retraso, reducción de dosis o retirada de capecitabina por toxicidad en pacientes y el número de variantes en *DPYD*, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Oncología Médica. Cáncer de colon y recto [Internet]. 2017 [citado 10 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://www.seom.org/es/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=2#content>
2. Chi S-Q, Tian Y, Li J, Tong D, Kong X-X, Poston G, et al. Time-dependent and nonlinear effects of prognostic factors in nonmetastatic colorectal cancer. *Cancer Med* [Internet]. 2017; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28707427>
3. Faivre J, Bossard N, Jooste V, GRELL EUROCARE-5 Working Group. Trends in net survival from colon cancer in six European Latin countries: results from the SUDCAN population-based study. *Eur J Cancer Prev* [Internet]. 2017; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005604>
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras de Cáncer en España 2017 [Internet]. 2017 [citado 17 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105941-las-cifras-del-cancer-en-espana-2017>
5. Cancer tomorrow. GLOBOCAN [Internet]. 2012 [citado 17 de marzo de 2017]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?population=222995&selection_pop=182724&Text-p=Spain&selection_cancer=5060&Text-c=Colorectum&pYear=23&type=0&window=1&submit=Execute
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: 33 IARC CancerBase [Internet]. International Agency for Research on Cancer. 2013 [citado 17 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
7. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799-825.
8. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz D, Chirlaque MD for the Colorectal Cancer Working Group. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Annals Oncol* 2010; 21(Suppl 3):iii76-iii82.
9. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Alemán A, et al. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa [Internet]. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). 2014 [citado 17 de marzo de 2017]. Disponible en: <http://redecn.org/es/page.cfm?id=196&title=estimaciones-de-la>
10. Kristo I, Riss S, Argeny S, Maschke S, Chitsabesan P, Stift A. Incidental adenocarcinoma in patients undergoing surgery for stricturing Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(3):472-7.
11. Bezzio C, Festa S, Saibeni S, Papi C. Chemoprevention of colorectal cancer in ulcerative colitis: digging deep in current evidence. *Expert Rev Gastroenterol*

- Hepatol. 2017;11(4):339-47.
12. Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. *Am J Med.* 1999;106(1A):3S-6S; discussion 50S-51S.
13. Zhang X, Keum N, Wu K, Smith-Warner SA, Ogino S, Chan AT, et al. Calcium intake and colorectal cancer risk: Results from the nurses' health study and health professionals follow-up study. *Int J Cancer.* 2016;139(10):2232-42.
14. Platz EA, Willett WC, Colditz GA, Rimm EB, Spiegelman D, Giovannucci E. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. *Cancer Causes Control.* 2000;11(7):579-88.
15. Seibert RG, Hanchate AD, Berz JP, Schroy PC. National Disparities in Colorectal Cancer Screening Among Obese Adults. *Am J Prev Med.* 2017;53(2):e41-9.
16. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011;22(9):1958-72.
17. Hooker CM, Gallicchio L, Genkinger JM, Comstock GW, Alberg AJ. A prospective cohort study of rectal cancer risk in relation to active cigarette smoking and passive smoke exposure. *Ann Epidemiol.* 2008;18(1):28-35.
18. Flossmann E, Rothwell PM, British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet.* 2007;369(9573):1603-13.
19. Ford AC, Veldhuyzen van Zanten SJO, Rodgers CC, Talley NJ, Vakil NB, Moayyedi P. Diagnostic utility of alarm features for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2008;57(11):1545-53.
20. Zhou Y, Abel GA, Hamilton W, Pritchard-Jones K, Gross CP, Walter FM, et al. Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;14(1):45-56.
21. Matsuda T, Ono A, Sekiguchi M, Fujii T, Saito Y. Advances in image enhancement in colonoscopy for detection of adenomas. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(5):305-14.
22. American Joint Committee on Cancer. Colon and Rectum Cancer Staging. 7th Edition [Internet]. [citado 20 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/colonmedium.pdf>
23. Guisado R, López A. Enfermedades del colon. *Enfermería Médico-Quirúrgica.* Vol III. Colección Enfermería S21. 2ª ed. Madrid: Difusión Avances de Enfermería (DAE). 2009: 1628-1647.
24. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon Cancer Version 1.2017 [Internet]. National Comprehensive Cancer Network. 2016. Disponible en: www.nccn.org
25. Belderbos TDG, Leenders M, Moons LMG, Siersema PD. Local recurrence after

- endoscopic mucosal resection of nonpedunculated colorectal lesions: systematic review and meta-analysis. *Endoscopy*. 2014;46(5):388-402.
26. Amelung FJ, Mulder CLJ, Verheijen PM, Draaisma WA, Siersema PD, Consten ECJ. Acute resection versus bridge to surgery with diverting colostomy for patients with acute malignant left sided colonic obstruction: Systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol*. 2015;24(4):313-21.
 27. Hadden WJ, de Reuver PR, Brown K, Mittal A, Samra JS, Hugh TJ. Resection of colorectal liver metastases and extra-hepatic disease: a systematic review and proportional meta-analysis of survival outcomes. *HPB*. 2016;18(3):209-20.
 28. Hong TS, Ritter MA, Tomé WA, Harari PM. Intensity-modulated radiation therapy: emerging cancer treatment technology. *Br J Cancer*. 2005;92(10):1819-24.
 29. Gérard J-P, Conroy T, Bonnetain F, Bouché O, Chapet O, Closon-Dejardin M-T, et al. Preoperative Radiotherapy With or Without Concurrent Fluorouracil and Leucovorin in T3-4 Rectal Cancers: Results of FFCD 9203. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4620-5.
 30. Mirnezami R, Chang GJ, Das P, Chandrakumaran K, Tekkis P, Darzi A, et al. Intraoperative radiotherapy in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of techniques, long-term outcomes, and complications. *Surg Oncol*. 2013;22(1):22-35.
 31. Siriwardena AK, Mason JM, Mullamitha S, Hancock HC, Jegatheeswaran S. Management of colorectal cancer presenting with synchronous liver metastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(8):446-59.
 32. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: Current options, current evidence. *J Clin Oncol*. 2005;23(20):4553-60.
 33. Miyamoto Y, Oki E, Saeki H, Maehara Y, Baba H. Recent Advances in Systemic Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2016;43(1):15-23.
 34. Board RE, Valle JW. Metastatic colorectal cancer: current systemic treatment options. *Drugs*. 2007;67(13):1851-67.
 35. Chua W, Kho PS, Moore MM, Charles KA, Clarke SJ. Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;79(3):224-50.
 36. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Trifluridina/tipiracilo hidrocloreuro. [citado 19 de septiembre de 2017]; Disponible en:
https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/1161096001/FT_1161096001.pdf
 37. Informe de Posicionamiento Terapéutico de trifluridina/tipiracil hidrocloreuro (Lonsurf®) en cáncer colorrectal. [citado 19 de septiembre de 2017]; Disponible en:
<https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-trifluridina-Lonsurf-cancer-colorrectal.pdf>

38. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Fluorouracilo [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/ft/71868/FichaTecnica_71868.html
39. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Xeloda [Internet]. [citado 10 de abril de 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/00163002/FT_00163002.pdf
40. The Pharmacogenomics Knowledgebase [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/>
41. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(4):237-42.
42. Quidde J, Arnold D, Stein A. Clinical management of localized colon cancer with capecitabine. *Clin Med Insights Oncol*. 2012;6:363-73.
43. Lam SW, Guchelaar HJ, Boven E. The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rev*. 2016;50:9-22.
44. Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhami M, Godfrey T, et al. Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(25):4069-77.
45. Kidd EA, Yu J, Li X, Shannon WD, Watson MA, McLeod HL. Variance in the Expression of 5-Fluorouracil Pathway Genes in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(7):2612-9.
46. Muhale FA, Wetmore BA, Thomas RS, McLeod HL. Systems pharmacology assessment of the 5-fluorouracil pathway. *Pharmacogenomics*. 2011;12(3):341-50.
47. Roosild TP, Castronovo S. Active Site Conformational Dynamics in Human Uridine Phosphorylase 1. *PLoS One*. 2010;5(9):e12741.
48. Roosild TP, Castronovo S, Fabbiani M, Pizzorno G. Implications of the structure of human uridine phosphorylase 1 on the development of novel inhibitors for improving the therapeutic window of fluoropyrimidine chemotherapy. *BMC Struct Biol*. 2009;9(1):14.
49. Roosild TP, Castronovo S, Villosio A, Ziemba A, Pizzorno G. A novel structural mechanism for redox regulation of uridine phosphorylase 2 activity. *J Struct Biol*. 2011;176(2):229-37.
50. Sakamoto K, Yokogawa T, Ueno H, Oguchi K, Kazuno H, Ishida K, et al. Crucial roles of thymidine kinase 1 and deoxyUTPase in incorporating the antineoplastic nucleosides trifluridine and 2'-deoxy-5-fluorouridine into DNA. *Int J Oncol*. 2015;46(6):2327-34.
51. Negrei C, Hudita A, Ginghina O, Galateanu B, Voicu SN, Stan M, et al. Colon Cancer Cells Gene Expression Signature As Response to 5- Fluorouracil, Oxaliplatin, and

- Folinic Acid Treatment. *Front Pharmacol*. 2016;7:172.
52. Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, Wang K, Diasio RB. Phenotypic Profiling of DPYD Variations Relevant to 5-Fluorouracil Sensitivity Using Real-time Cellular Analysis and In Vitro Measurement of Enzyme Activity. *Cancer Res*. 2013;73(6):1958-68.
 53. Raftery L, Goldberg RM. Optimal delivery of cytotoxic chemotherapy for colon cancer. *Cancer J*. 2010;16(3):214-9.
 54. Danenberg P V. Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 1977;473(2):73-92.
 55. Uchida K, Danenberg P V, Danenberg KD, Grem JL. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer*. 2008;8:386.
 56. Wilson PM, Danenberg P V., Johnston PG, Lenz H-J, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(5):282-98.
 57. Suh JR, Herbig AK, Stover PJ. New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr*. 2001;21(1):255-82.
 58. Sakamoto E, Tsukioka S, Oie S, Kobunai T, Tsujimoto H, Sakamoto K, et al. Folylpolylglutamate synthase and gamma-glutamyl hydrolase regulate leucovorin-enhanced 5-fluorouracil anticancer activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(4):801-7.
 59. Kunz C, Focke F, Saito Y, Schuermann D, Lettieri T, Selfridge J, et al. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol*. 2009;7(4):e91.
 60. An Q, Robins P, Lindahl T, Barnes DE. 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *Cancer Res*. 2007;67(3):940-5.
 61. Piedbois P, Rougier P, Buyse M, Pignon J, Ryan L, Hansen R, et al. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):301-8.
 62. Thirion P, Michiels S, Pignon JP, Buyse M, Braud AC, Carlson RW, et al. Modulation of Fluorouracil by Leucovorin in Patients With Advanced Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Clin Oncol*. 2004;22(18):3766-75.
 63. Meyerhardt J a, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(5):476-87.
 64. Twelves CJ. Xeloda® in Adjuvant Colon Cancer Therapy (X-ACT) Trial: Overview of Efficacy, Safety, and Cost-Effectiveness. *Clin Colorectal Cancer*. 2006;6(4):278-87.
 65. Twelves C, Scheithauer W, McKendrick J, Seitz J-F, Van Hazel G, Wong A, et al.

- Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1190-7.
66. Cassidy J, Saltz L, Twelves C, Van Cutsem E, Hoff P, Kang Y, et al. Efficacy of capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal and gastric cancers: a meta-analysis of individual data from 6171 patients. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2604-9.
67. Schmoll H-J, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared With Fluorouracil/Folinic Acid As Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer: Final Results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2015;33(32):3733-40.
68. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br J Cancer.* 2011;105(1):58-64.
69. Venderbosch S, Doornebal J, Teerenstra S, Lemmens W, Punt CJA, Koopman M. Outcome of first line systemic treatment in elderly compared to younger patients with metastatic colorectal cancer: A retrospective analysis of the CAIRO and CAIRO2 studies of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). *Acta Oncol.* 2012;51(7):831-9.
70. Kalia M. Personalized oncology: Recent advances and future challenges. *Metabolism.* 2012;64(3):S16-21.
71. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(4):337-45.
72. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.
73. Florez J. *Farmacología Humana*. 3o Edición. Barcelona: 1997.
74. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, et al. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: The FOCUS trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(33):5519-28.
75. Rothenberg ML, Meropol NJ, Poplin EA, Van Cutsem E, Wadler S. Mortality associated with irinotecan plus bolus fluorouracil/leucovorin: summary findings of an independent panel. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3801-7.
76. Cortejoso L, García-González X, García MI, García-Alfonso P, Sanjurjo M, López-Fernández LA. Cost-effectiveness of screening for DPYD polymorphisms to prevent neutropenia in cancer patients treated with fluoropyrimidines. *Pharmacogenomics.* 2016;17(9):979-84.
77. Shankaran V. Cost Considerations in the Evaluation and Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(8):41.

78. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998;279(15):1200-5.
79. Belloso, WH; Redal MA. La farmacogenomica y el camino hacia la medicina personalizada. *Med (Buenos Aires)*. 2010;70:265-74.
80. Hurvitz S, Guerin A, Brammer M, Guardino E, Zhou Z-Y, Latremouille Viau D, et al. Investigation of Adverse-Event-Related Costs for Patients With Metastatic Breast Cancer in a Real-World Setting. *Oncologist*. 2014;19(9):901-8.
81. Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE). Disponible en: [Internet]. [citado 20 de mayo de 2017]. Disponible en: https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf
82. Köhne C-H, Wils J, Lorenz M, Schöffski P, Voigtmann R, Bokemeyer C, et al. Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastroint. *J Clin Oncol*. 2003;21(20):3721-8.
83. Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, Grávalos C, Robles L, González-Haba E, et al. [Validation of genetic polymorphisms associated to the toxicity of chemotherapy in colorectal cancer patients]. *Farm Hosp*. 2014;38(4):283-90.
84. Pentheroudakis G, Twelves C. The rational development of capecitabine from the laboratory to the clinic. *Anticancer Res*. 2002;22(6B):3589-96.
85. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19(21):4097-106.
86. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19(8):2282-92.
87. Mayer RJ. Oral versus intravenous fluoropyrimidines for advanced colorectal cancer: by either route, it's all the same. *J Clin Oncol*. 2001;19(21):4093-6.
88. Rosmarin D, Palles C, Pagnamenta A, Kaur K, Pita G, Martin M, et al. A candidate gene study of capecitabine-related toxicity in colorectal cancer identifies new toxicity variants at DPYD and a putative role for ENOSF1 rather than TYMS. *Gut*. 2015;64(1):111-20.
89. Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown JB, Sakaeda T, Okuno Y. Adverse event profiles of 5-fluorouracil and Capecitabine: Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS, and reproducibility of clinical observations. *Int J Med Sci*. 2012;9(1):33-9.
90. European Medicines Agency [Internet]. [citado 3 de junio de 2017]. Disponible

- en: <http://www.ema.europa.eu/ema>
91. Saltz LB, Cox J V, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343(13):905-14.
 92. Mocellin S, Baretta Z, Roqué i Figuls M, Solà I, Martin-Richard M, Hallum S, et al. Second-line systemic therapy for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1:CD006875.
 93. Strimpakos AS, Syrigos KN, Saif MW. Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2009;9(3):147-60.
 94. Belloso WH, Redal MA. [Pharmacogenomics and the path towards personalized medicine]. *Medicina (B Aires)*. 2010;70(3):265-74.
 95. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001;7(5):201-4.
 96. Piquette-Miller M, Grant DM. The art and science of personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81(3):311-5.
 97. López Lavid C, García Cebrián A, Caloto MT. Estudios de investigación de resultados en salud: concepto, métodos y aplicaciones prácticas [Internet]. Monografía X. Farmaeconomía e investigación de resultados en la salud: Principios y práctica. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2001. p. 26. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/issue/view/105>
 98. Kalow W. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and pharmacobiology. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70(1):1-4.
 99. Brockmöller J, Tzvetkov M V. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(2):133-57.
 100. Evans WE, Relling M V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487-91.
 101. Isaza C, Sepulveda J, Henao J [Internet]. Pharmacogenomics in medicine. 2009 [citado 17 de abril de 2017]. Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/662/821>
 102. Ikediobi ON. Somatic pharmacogenomics in cancer. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(5):305-14.
 103. Leucuta SE, Vlase L. Pharmacokinetics and metabolic drug interactions. *Curr Clin Pharmacol*. 2006;1(1):5-20.
 104. Bhathena A, Spear BB. Pharmacogenetics: improving drug and dose selection. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(5):639-46.
 105. Wood AJJ, Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug

- Targets, and Side Effects. *N Engl J Med*. 2003;348(6):538-49.
106. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*. 1998;8(4):283-9.
 107. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
 108. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
 109. Huang S-M, Temple R. Is This the Drug or Dose for You?: Impact and Consideration of Ethnic Factors in Global Drug Development, Regulatory Review, and Clinical Practice. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84(3):287-94.
 110. Kalow W. Contribution of hereditary factors to the response to drugs. *Fed Proc*. 1965;24(6):1259-65.
 111. European Medicines Agency. Definitions for Genomic Biomarkers, Pharmacogenomics, Pharmacogenetics, Genomic Data, and Sample Coding Categories [Internet]. [citado 3 de junio de 2017]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002880.pdf
 112. Weng L, Zhang L, Peng Y, Huang RS. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics*. 2013;14(3):315-24.
 113. Daly AK. Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms. *Biochem J*. 2010;429(3):435-49.
 114. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, et al. Whole-Genome Patterns of Common DNA Variation in Three Human Populations. *Science*. 2005;307(5712):1072-9.
 115. Sadee W. Measuring cis-acting regulatory variants genome-wide: new insights into expression genetics and disease susceptibility. *Genome Med*. 2009;1(12):116.
 116. Sadee W, Wang D, Papp AC, Pinsonneault JK, Smith RM, Moyer RA, et al. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(3):355-65.
 117. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex*. 2013;149(2):220-8.
 118. Arnedo M, Baiget M, Jané F. Aplicacions de la Farmacogenètica en la prevenció d'efectes adversos i en l'optimització i millora de l'aficàcia terapèutica. Barcelona: 2013.
 119. NCBI RSS Feed: dbSNP News and Announcements [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2017]. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/feed/rss.cgi?ChanKey=dbsnpnews>
120. Lubomirov R, Telenti A, Rotger M. [General concepts and study methods in pharmacogenetics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 Suppl 6:4-9.
 121. Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet*. 1999;22(2):139-44.
 122. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296(5576):2225-9.
 123. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005;437(7063):1299-320.
 124. International HapMap Consortium KA, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.
 125. Chapman JM, Cooper JD, Todd JA, Clayton DG. Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power. *Hum Hered*. 2003;56(1-3):18-31.
 126. Sved JA. Linkage Disequilibrium and Its Expectation in Human Populations. *Twin Res Hum Genet*. 2009;12(1):35-43.
 127. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):106-20.
 128. de Bakker PIW, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet*. 2005;37(11):1217-23.
 129. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*. 2015;526(7571):75-81.
 130. Conde L, Vaquerizas JM, Dopazo H, Arbiza L, Reumers J, Rousseau F, et al. PupaSuite: finding functional single nucleotide polymorphisms for large-scale genotyping purposes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W621-5.
 131. Lorente-Galdos B, Medina I, Morcillo-Suarez C, Heredia T, Carreño-Torres A, Sangrós R, et al. Select your SNPs (SYSNPs): a web tool for automatic and massive selection of SNPs. *Int J Data Min Bioinform*. 2012;6(3):324-34.
 132. Duan X, Gao Y, Yang H, Feng T, Jin T, Long Y, et al. Polymorphisms in the DUSP10 gene are associated with sex-specific colorectal cancer risk in a Han population. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):2018-25.
 133. Johnson ME, Zhao J, Schug J, Deliard S, Xia Q, Guy VC, et al. Two novel type 2 diabetes loci revealed through integration of TCF7L2 DNA occupancy and SNP association data. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2014;2(1):e000052.
 134. Passarelli MN, Phipps AI, Potter JD, Makar KW, Coghill AE, Wernli KJ, et al.

- Common single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor β promoter are associated with colorectal cancer survival in postmenopausal women. *Cancer Res* January. 2013;15(732):767-75.
135. Liu L, Zhong R, Wei S, Yin J-Y, Xiang H, Zou L, et al. Interactions between Genetic Variants in the Adiponectin, Adiponectin Receptor 1 and Environmental Factors on the Risk of Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2011;6(11):e27301.
 136. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet*. 2007;39(8):984-8.
 137. Barry EL, Mott LA, Sandler RS, Ahnen DJ, Baron JA. Variants Downstream of the Ornithine Decarboxylase Gene Influence Risk of Colorectal Adenoma and Aspirin Chemoprevention. *Cancer Prev Res*. 2011;4(12):2072-82.
 138. Esparragón F, Rodríguez Pérez JC, García Bello MA. Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica. *Nefrología*. 2009;29(6):582-8.
 139. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-78.
 140. Wang H, Schmit SL, Haiman CA, Keku TO, Kato I, Palmer JR, et al. Novel colon cancer susceptibility variants identified from a genome-wide association study in African Americans. *Int J Cancer*. 2017;140(12):2728-33.
 141. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001;2(2):91-9.
 142. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Part 1: background, methodology, and clinical adoption of pharmacogenetics. *Oncologist*. 2011;16(6):811-9.
 143. Cegen | Centro Nacional de Genotipado [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.usc.es/cegen/>
 144. Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M, Guinó E, Durán G, et al. Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(3):209-17.
 145. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol*. 2009;25(4):195-203.
 146. Jacob HJ, Abrams K, Bick DP, Brodie K, Dimmock DP, Farrell M, et al. Genomics in Clinical Practice: Lessons from the Front Lines. *Sci Transl Med*. 2013;5(194):194cm5.
 147. Biesecker LG, Shianna K V, Mullikin JC. Exome sequencing: the expert view. *Genome Biol*. 2011;12(9):128.
 148. Chan EY. Next-Generation Sequencing Methods: Impact of Sequencing Accuracy on SNP Discovery. En: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2009. p. 95-111.

149. Bainbridge MN, Wang M, Wu Y, Newsham I, Muzny DM, Jefferies JL, et al. Targeted enrichment beyond the consensus coding DNA sequence exome reveals exons with higher variant densities. *Genome Biol.* 2011;12(7):R68.
150. Cantacessi C, Jex AR, Hall RS, Young ND, Campbell BE, Joachim A, et al. A practical, bioinformatic workflow system for large data sets generated by next-generation sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):e171.
151. J. Zhang, R. Chiodini, A. Badr GZ. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics.* 2011;38(3):95-109.
152. El-Deiry WS, Vijayvergia N, Xiu J, Scicchitano A, Lim B, Yee NS, et al. Molecular profiling of 6,892 colorectal cancer samples suggests different possible treatment options specific to metastatic sites. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(12):1726-37.
153. Zhang J, Wang X, de Voer RM, Hehir-Kwa JY, Kamping EJ, Weren RDA, et al. A molecular inversion probe-based next-generation sequencing panel to detect germline mutations in Chinese early-onset colorectal cancer patients. *Oncotarget.* 2017;8(15):24533-47.
154. Gong J, Cho M, Sy M, Salgia R, Fakih M. Molecular profiling of metastatic colorectal tumors using next-generation sequencing: A single-institution experience. *Oncotarget.* 2017;8(26):42198-213.
155. Boige V, Mendiboure J, Pignon J-P, Lorient M-A, Castaing M, Barrois M, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2556-64.
156. Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):3075-9.
157. Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, Kuten A, Gruber SB, Lejbkowitz F, et al. Clinical implications of UGT1A1*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer.* 2011;117(14):3156-62.
158. López M, Criado MT, Esteban B, López MC. Toxicidad grave por 5-fluorouracilo asociada a deficiencia de dihidropirimidina deshidrogenasa. *Farm Hosp.* 2008;32(1):54-6.
159. Kuilenburg ABP van, Meijer J, Tanck MWT, Dobritzsch D, Zoetekouw L, Dekkers L-L, et al. Phenotypic and clinical implications of variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):754-62.
160. Falvella F, Caporale M, Cheli S, Martinetti A, Berenato R, Maggi C, et al. Undetected Toxicity Risk in Pharmacogenetic Testing for Dihydropyrimidine Dehydrogenase. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8884-95.
161. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of dpyd variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 2014;74(9):2545-54.

162. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3455-68.
163. van Kuilenburg ABP, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJM, et al. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J*. 2002;364(Pt 1):157-63.
164. Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S, Poirier AL, Gamelin L, Morel A, et al. 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett*. 2007;249(2):271-82.
165. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: A prospective clinical trial by the German 5-FU toxicity study group. *J Clin Oncol*. 2008;26(13):2131-8.
166. Etienne-Grimaldi M-C, Boyer J-C, Beroud C, Mbatchi L, van Kuilenburg A, Bobin-Dubigeon C, et al. New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. *PLoS One*. 2017;12(5):e0175998.
167. Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Boot H, et al. Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *J Clin Oncol*. 2016;34(3):227-34.
168. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(6):640-5.
169. Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, Danesi R, Canonico PL, Genazzani AA. DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013;14(11):1255-72.
170. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1639-50.
171. Lee AM, Shi Q, Pavey E, Alberts SR, Sargent DJ, Sinicrope F a, et al. DPYD Variants as Predictors of 5-fluorouracil Toxicity in Adjuvant Colon Cancer Treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(12):1-12.
172. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, et al. Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. *PLoS One*. 2008;3(12):1-7.

173. Meulendijks D, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Improving safety of fluoropyrimidine chemotherapy by individualizing treatment based on dihydropyrimidine dehydrogenase activity – Ready for clinical practice? *Cancer Treat Rev.* 2016;50:23-34.
174. Milano G. Highlight on DPYD gene polymorphisms and treatment by capecitabine. *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;245(sup245):S30-3.
175. Toffoli G, Giodini L, Buonadonna A, Berretta M, De Paoli A, Scalone S, et al. Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. *Int J Cancer.* 2015;137(12):2971-80.
176. Froehlich TK, Amstutz U, Aebi S, Joerger M, Largiadèr CR. Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity. *Int J Cancer.* 2015;136(3):730-9.
177. Nobili S, Napoli C, Landini I, Morganti M, Cianchi F, Valanzano R, et al. Identification of potential pharmacogenomic markers of clinical efficacy of 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Int J cancer.* 2011;128(8):1935-45.
178. Marcuello E, Altés A, del Rio E, César A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J cancer.* 2004;112(5):733-7.
179. Mandola M V, Stoeckelmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics.* 2004;14(5):319-27.
180. Afzal S, Gusella M, Vainer B, Vogel UB, Andersen JT, Broedbaek K, et al. Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3822-9.
181. Rosmarin D, Palles C, Church D, Domingo E, Jones A, Johnstone E, et al. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: Investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2014;32(10):1031-9.
182. Zhao J, Li W, Zhu D, Yu Q, Zhang Z, Sun M, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in MTHFR and ABCG2 with the different efficacy of first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Med Oncol.* 2014;31(1):802.
183. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414-7.
184. Long S, Goldblatt J. MTHFR genetic testing: Controversy and clinical implications. *Aust Fam Physician.* 2016;45(4):237-40.
185. Wu N-C, Su S-M, Lin T-J, Chin J, Hou C-F, Yang J-Y, et al.

- Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and fluorouracil-based treatment in Taiwan colorectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2015;26(8):888-93.
186. Thomas F, Motsinger-Reif AA, Hoskins JM, Dvorak A, Roy S, Alyasiri A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1654-62.
187. Terrazzino S, Agostini M, Pucciarelli S, Pasetto LM, Friso ML, Ambrosi A, et al. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogenet Genomics*. 2006;16(11):817-24.
188. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier A-L, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(4):256-67.
189. Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A, Kusano M. Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Ann Oncol*. 2011;22(2):355-61.
190. Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(3):817-25.
191. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1549-57.
192. Glimelius B, Garmo H, Berglund a, Fredriksson L a, Berglund M, Kohnke H, et al. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2011;11(1):61-71.
193. Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(5):665-72.
194. Dahan L, Ciccolini J, Evrard A, Mbatchi L, Tibbitts J, Ries P, et al. Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. *J Clin Oncol*. 2012;30(4):e41-4.
195. Caronia D, Martin M, Sastre J, de la Torre J, García-Sáenz JA, Alonso MR, et al. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin Cancer Res*. 2011;17(7):2006-13.
196. Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A, Fairbanks L, Lewis CM, Harper P, et al. Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer*. 2013;108(12):2505-15.
197. García-gonzález X, Cortejoso L, García MI, García- P, Sanjurjo M, López-fernández

- LA. Variants in CDA and ABCB1 are predictors of capecitabine- related adverse reactions in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(8):6422-30.
198. Quinney SK, Sanghani SP, Davis WI, Hurley TD, Sun Z, Murry DJ, et al. Hydrolysis of Capecitabine to 5'-Deoxy-5-fluorocytidine by Human Carboxylesterases and Inhibition by Loperamide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(3):1011-6.
199. Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR, et al. Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics*. 2004;84(4):661-8.
200. Wu MH, Chen P, Wu X, Liu W, Strom S, Das S, et al. Determination and analysis of single nucleotide polymorphisms and haplotype structure of the human carboxylesterase 2 gene. *Pharmacogenetics*. 2004;14(9):595-605.
201. Hamzic S, Kummer D, Milesi S, Mueller D, Joerger M, Aebi S, et al. Novel genetic variants in carboxylesterase 1 predict severe early-onset capecitabine-related toxicity [Internet]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28139840>
202. Ribelles N, López-Siles J, Sánchez A, González E, Sánchez MJ, Carabantes F, et al. A carboxylesterase 2 gene polymorphism as predictor of capecitabine on response and time to progression. *Curr Drug Metab*. 2008;9(4):336-43.
203. Martin M, Martinez N, Ramos M, Calvo L, Lluch A, Zamora P, et al. Standard Versus Continuous Administration of Capecitabine in Metastatic Breast Cancer (GEICAM/2009-05): A Randomized, Noninferiority Phase II Trial With a Pharmacogenetic Analysis. *Oncologist*. 2015;20(2):111-2.
204. Derwinger K, Lindskog EB, Palmqvist E, Wettergren Y. Changes in thymidine phosphorylase gene expression related to treatment of rectal cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(6):2447-51.
205. Jennings B a., Loke YK, Skinner J, Keane M, Chu GS, Turner R, et al. Evaluating Predictive Pharmacogenetic Signatures of Adverse Events in Colorectal Cancer Patients Treated with Fluoropyrimidines. *PLoS One*. 2013;8(10):1-9.
206. Wang J, Wang X, Zhao M, Choo SP, Ong SJ, Ong SYK, et al. Potentially Functional SNPs (pfSNPs) as Novel Genomic Predictors of 5-FU Response in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *PLoS One*. 2014;9(11):e111694.
207. Shintani M, Urano M, Takakuwa Y, Kuroda M, Kamoshida S. Immunohistochemical characterization of pyrimidine synthetic enzymes, thymidine kinase-1 and thymidylate synthase, in various types of cancer. *Oncol Rep*. 2010;23(5):1345-50.
208. Huang M-Y, Wu C-H, Huang C-M, Chung F-Y, Huang C-W, Tsai H-L, et al. DPYD, TYMS, TYMP, TK1, and TK2 Genetic Expressions as Response Markers in Locally Advanced Rectal Cancer Patients Treated with Fluoropyrimidine-Based Chemoradiotherapy [Internet]. *BioMed Research International*. 2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455740>
209. Akai F, Hosono H, Hirasawa N, Hiratsuka M. Novel single nucleotide

- polymorphisms of the dihydropyrimidinase gene (DPYS) in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2015;30(1):127-9.
210. Fidlerova J, Kleiblova P, Bilek M, Kormunda S, Formankova Z, Novotny J, et al. Contribution of dihydropyrimidinase gene alterations to the development of serious toxicity in fluoropyrimidine-treated cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(4):661-9.
211. van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Zonnenberg BA, Zoetekouw L, Baas F, Matsuda K, et al. Dihydropyrimidinase deficiency and severe 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4363-7.
212. Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB. Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(11):973-87.
213. Kummer D, Froehlich TK, Joerger M, Aebi S, Sistonen J, Amstutz U, et al. Dihydropyrimidinase and β -ureidopropionase gene variation and severe fluoropyrimidine-related toxicity. *Pharmacogenomics*. 2015;16(12):1367-77.
214. Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Novotny J, Kleibl Z. Contribution of the β -ureidopropionase (UPB1) gene alterations to the development of fluoropyrimidine-related toxicity. *Pharmacol Rep*. 2012;64(5):1234-42.
215. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10316-30.
216. Gonzalez-Haba E, García MI, Cortejoso L, López-Lillo C, Barrueco N, García-Alfonso P, et al. ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2010;11(12):1715-23.
217. High Pure PCR Template Preparation Kit [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://lifescience.roche.com/documents/High-Pure-PCR-Template-Preparation-Kit.pdf>
218. TaqMan® SNP Genotyping Assays. TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays, TaqMan® Custom SNP Genotyping Assays, and TaqMan® Drug Metabolism Enzyme Genotyping Assays [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_man.pdf
219. Ion AmpliSeq™ Exome RDY Library Preparation for use with: Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit Ion AmpliSeq™ Exome S5™ RDY Kit [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A27192>
220. ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041203.pdf

221. Life Technologies [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: www.lifetechnologies.com
222. SIFT dbSNP [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: http://sift.jcvi.org/www/SIFT_dbSNP.html
223. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs [Internet]. [citado 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
224. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
225. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.
226. Home - SNP - NCBI [Internet]. [citado 17 de agosto de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
227. Duley JA, Ni M, Shannon C, Norris RL, Sheffield L, Harris M, et al. Towards a test to predict 5-fluorouracil toxicity: Pharmacokinetic data for thymine and two sequential metabolites following oral thymine administration to healthy adult males. *Eur J Pharm Sci*. 2016;81:36-41.
228. Thavaneswaran S, Kok PS, Price T. Evaluating the addition of oxaliplatin to single agent fluoropyrimidine in the treatment of locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017;17(10):965-79.
229. Zou X, Wang Q, Zhang J. Comparison of 5-FU-based and Capecitabine-based Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Patients With Rectal Cancer: A Meta-analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2017;16(3):e123-39.
230. Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, González-Haba E, Escolar F, Sanjurjo M, et al. Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(6):1463-72.
231. Gordon MA, Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiery A, Nagashima F, et al. Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics*. 2011;12(1):27-39.
232. Gulhati P, Raghav K, Shroff RT, Varadhachary GR, Kopetz S, Javle M, et al. Bevacizumab combined with capecitabine and oxaliplatin in patients with advanced adenocarcinoma of the small bowel or ampulla of vater: A single-center, open-label, phase 2 study. *Cancer*. 2017;123(6):1011-7.
233. Kerr RS, Love S, Segelov E, Johnstone E, Falcon B, Hewett P, et al. Adjuvant capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine alone in patients with colorectal cancer (QUASAR 2): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(11):1543-57.

234. Baird R, Biondo A, Chhaya V, McLachlan J, Karpathakis A, Rahman S, et al. Toxicity associated with capecitabine plus oxaliplatin in colorectal cancer before and after an institutional policy of capecitabine dose reduction. *Br J Cancer*. 2011;104(1):43-50.
235. Meulendijks D, van Hasselt JGC, Huitema ADR, van Tinteren H, Deenen MJ, Beijnen JH, et al. Renal function, body surface area, and age are associated with risk of early-onset fluoropyrimidine-associated toxicity in patients treated with capecitabine-based anticancer regimens in daily clinical care. *Eur J Cancer*. 2016;54:120-30.
236. Pellicer M, García-González X, García MI, Robles L, Grávalos C, García-Alfonso P, et al. Identification of new SNPs associated with severe toxicity to capecitabine. *Pharmacol Res*. 2017;120:133-7.
237. Wheeler HE, González-Neira A, Pita G, de la Torre-Montero JC, Alonso R, Lopez-Fernandez LA et al. Identification of genetic variants associated with capecitabine- induced hand-foot syndrome through integration of patient and cell-line genomic analyses. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(5):231-7.
238. Gentil BJ, O’Ferrall E, Chalk C, Santana LF, Durham HD, Massie R. A New Mutation in FIG4 Causes a Severe Form of CMT4J Involving TRPV4 in the Pathogenic Cascade. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(9):789-99.
239. Bose D, D. V, Shetty M, J. K, Kutty AVM. Identification of intronic-splice site mutations in GATA4 gene in Indian patients with congenital heart disease [Internet]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28843068>
240. Yao L, Tak YG, Berman BP, Farnham PJ. Functional annotation of colon cancer risk SNPs. *Nat Commun*. 2014;5:5114.
241. Tanskanen T, van den Berg L, Välimäki N, Aavikko M, Ness-Jensen E, Hveem K, et al. Genome-wide association study and meta-analysis in Northern European populations replicate multiple colorectal cancer risk loci [Internet]. *International Journal of Cancer*. 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28960316>
242. Pellicer M, García-González X, García MI, Blanco C, García-Alfonso P, Robles L, et al. Use of exome sequencing to determine the full profile of genetic variants in the fluoropyrimidine pathway in colorectal cancer patients affected by severe toxicity. *Pharmacogenomics*. 2017;18(13):1215-23.
243. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(4):688-700.
244. Mizzi C, Peters B, Mitropoulou C, Mitropoulos K, Katsila T, Agarwal MR, et al. Personalized pharmacogenomics profiling using whole-genome sequencing. *Pharmacogenomics*. 2014;15(9):1223-34.

245. Gréen H, Hasmats J, Kupersmidt I, Edsgård D, de Petris L, Lewensohn R, et al. Using Whole-Exome Sequencing to Identify Genetic Markers for Carboplatin and Gemcitabine-Induced Toxicities. *Clin Cancer Res*. 2016;22(2):366-73.
246. Ma W, Brodie S, Agersborg S, Funari VA, Albitar M. Significant Improvement in Detecting BRAF, KRAS, and EGFR Mutations Using Next-Generation Sequencing as Compared with FDA-Cleared Kits [Internet]. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2017 [citado 24 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28639239>
247. Rey J-M, Ducros V, Pujol P, Wang Q, Buisine M-P, Aissaoui H, et al. Improving Mutation Screening in Patients with Colorectal Cancer Predisposition Using Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagnostics*. 2017;19(4):589-601.
248. Jiménez-Escrig A, Gobernado I, Sánchez-Herranz A. Secuenciación de genoma completo: Un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Rev Neurol*. 2012;54(11):692-8.
249. Serrati S, De Summa S, Pilato B, Petriella D, Lacalamita R, Tommasi S, et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther*. 2016;9:7355-65.
250. Mudduluru G, Ilm K, Fuchs S, Stein U. Epigenetic silencing of miR-520c leads to induced S100A4 expression and its mediated colorectal cancer progression. *Oncotarget*. 2017;8(13):21081-94.
251. Yoshikawa T, Wu J, Otsuka M, Kishikawa T, Suzuki N, Takata A, et al. Repression of MicroRNA Function Mediates Inflammation-associated Colon Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2017;152(3):631-43.
252. Del Re M, Quaquareni E, Sottotetti F, Michelucci A, Palumbo R, Simi P, et al. Uncommon dihydropyrimidine dehydrogenase mutations and toxicity by fluoropyrimidines: a lethal case with a new variant. *Pharmacogenomics*. 2016;17(1):5-9.
253. Yoshida Y, Ogura K, Hiratsuka A, Aisu N, Yamada T, Kojima D, et al. 5-Fluorouracil Chemotherapy for Dihydropyrimidine Dehydrogenase-deficient Patients: Potential of the Dose-escalation Method. *Anticancer Res*. 2015;35(9):4881-7.
254. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) [Internet]. [citado 24 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>
255. van Kuilenburg ABP, Etienne-Grimaldi M-C, Mahamat A, Meijer J, Laurent-Puig P, Olschwang S, et al. Frequent intragenic rearrangements of DPYD in colorectal tumours. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(3):211-8.
256. Mercier C, Ciccolini J. Profiling dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in patients with cancer undergoing 5-fluorouracil/capecitabine therapy. *Clin Colorectal Cancer*. 2006;6(4):288-96.
257. Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer J-C, Duffaud F, et al. A Rapid and Inexpensive Method for Anticipating Severe Toxicity to Fluorouracil and

- Fluorouracil-based Chemotherapy. *Ther Drug Monit.* 2006;28(5):678-85.
258. The Allele Frequency Database [Internet]. [citado 23 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://alfred.med.yale.edu/>
259. Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Bilek M, Bouskova K, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma.* 2009;56(4):303-16.
260. Ruzzo A, Graziano F, Galli F, Galli F, Rulli E, Lonardi S, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients [Internet]. *British Journal of Cancer.* Nature Publishing Group; 2017. Disponible en: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2017.289>
261. Boige V, Vincent M, Alexandre P, Tejpar S, Landolfi S, Le Malicot K, et al. DPYD Genotyping to Predict Adverse Events Following Treatment With Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Stage III Colon Cancer: A Secondary Analysis of the PETACC-8 Randomized Clinical Trial. [Internet]. *JAMA oncology.* 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26794347>
262. Gross E, Ullrich T, Seck K, Mueller V, de Wit M, von Schilling C, et al. Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Hum Mutat.* 2003;22(6):498.
263. Gentile G, Botticelli A, Lionetto L, Mazzuca F, Simmaco M, Marchetti P, et al. Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(4):320-5.
264. Hwang IG, Ji JH, Kang JH, Lee HR, Lee H-Y, Chi K-C, et al. A multi-center, open-label, randomized phase III trial of first-line chemotherapy with capecitabine monotherapy versus capecitabine plus oxaliplatin in elderly patients with advanced gastric cancer. *J Geriatr Oncol.* 2017;8(3):170-5.
265. Lecomte T, Ferraz J-M, Zinzindohoué F, Lorient M-A, Tregouet D-A, Landi B, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10(17):5880-8.
266. Ulrich CM, Rankin C, Toriola AT, Makar KW, Altug-Teber Ö, Benedetti JK, et al. Polymorphisms in folate-metabolizing enzymes and response to 5-fluorouracil among patients with stage II or III rectal cancer (INT-0144; SWOG 9304). *Cancer.* 2014;120(21):3329-37.
267. Kim J, Jeon Y, Jang M, Kim J, Chong S, Ko K, et al. Association between folate metabolism-related polymorphisms and colorectal cancer risk. *Mol Clin Oncol.* 2015;3(3):639-48.

268. Liu H, Jin G, Wang H, Wu W, Liu Y, Qian J, et al. Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes and lung cancer risk: a case-control study in Chinese population. *Lung cancer*. 2008;61(1):21-9.
269. Li Y, Nie Y, Cao J, Tu S, Lin Y, Du Y, et al. G-A variant in miR-200c binding site of EFNA1 alters susceptibility to gastric cancer. *Mol Carcinog*. 2014;53(3):219-29.
270. Nelson CP, Goel A, Butterworth AS, Kanoni S, Webb TR, Marouli E, et al. Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2017;49(9):1385-91.
271. Labbé C, Ogaki K, Lorenzo-Betancor O, Carrasquillo MM, Heckman MG, McCarthy A, et al. Exonic Re-Sequencing of the Chromosome 2q24.3 Parkinson's Disease Locus. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128586.
272. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*. 2014;533(1):11-20.
273. van Huis-Tanja LH, Gelderblom H, Punt CJA, Guchelaar H-J. MTHFR polymorphisms and capecitabine-induced toxicity in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(4):208-18.
274. Afzal S, Jensen SA, Vainer B, Vogel U, Matsen JP, Sorensen JB, et al. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1660-6.
275. Custodio A, Moreno-Rubio J, Aparicio J, Gallego-Plazas J, Yaya R, Maurel J, et al. Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(9):2226-37.
276. Lee K-H, Chang HJ, Han S-W, Oh D-Y, Im S-A, Bang Y-J, et al. Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(4):843-51.
277. Zhang X, Bai Z, Chen B, Feng J, Yan F, Jiang Z, et al. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with response to fluorouracil-based chemotherapy in Chinese patients with gastric cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(20):3562-7.
278. Ding X, Chen W, Fan H, Zhu B. Cytidine deaminase polymorphism predicts toxicity of gemcitabine-based chemotherapy. *Gene*. 2015;559(1):31-7.
279. Cortejoso L, López-Fernández LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2012;13(10):1173-91.
280. Sugiyama E, Kaniwa N, Kim S-R, Kikura-Hanajiri R, Hasegawa R, Maekawa K, et al. Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):32-42.
281. Lemstrová R, Souček P, Melichar B, Mohelnikova-Duchonova B. Role of solute carrier transporters in pancreatic cancer: a review. *Pharmacogenomics*.

- 2014;15(8):1133-45.
282. Visscher H, Rassekh SR, Sandor GS, Caron HN, van Dalen EC, Kremer LC, et al. Genetic variants in SLC22A17 and SLC22A7 are associated with anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pharmacogenomics*. 2015;16(10):1065-76.
283. Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*. 2012;9(5):563-76.
284. Tashiro A, Tatsumi S, Takeda R, Naka A, Matsuoka H, Hashimoto Y, et al. High expression of organic anion transporter 2 and organic cation transporter 2 is an independent predictor of good outcomes in patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFOX-based chemotherapy. *Am J Cancer Res*. 2014;4(5):528-36.
285. Griffith M, Mwenifumbo JC, Cheung PY, Paul JE, Pugh TJ, Tang MJ, et al. Novel mRNA isoforms and mutations of uridine monophosphate synthetase and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(2):148-58.
286. Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Sasaki Y, Hirayama R. Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):3928-34.
287. WHO adverse reactions classification [Internet]. [citado 17 de agosto de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/advdrugreactions/en/
288. McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Green EM, King CR, Fuchs CS, et al. Pharmacogenetic Predictors of Adverse Events and Response to Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer: Results From North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3227-33.
289. Kamil M, Haron M, Yosuff N, Khalid I, Azman N. High frequency of hand foot syndrome with capecitabine. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2010;20(6):421-2.
290. ECOG Performance Status - ECOG-ACRIN [Internet]. [citado 2 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://ecog-acrin.org/resources/ecog-performance-status>

8.- ANEXOS

8.- ANEXOS

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)
BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 1 -



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA
COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL
CON TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

<input type="checkbox"/> CONTROLADA				
Nº	DESTINATARIO	FECHA ENTREGA	ENTREGADO POR	
			Nombre	Firma

☐ NO CONTROLADA

REVISIÓN	REALIZADO	FECHA	APROBADO	FECHA	ENTRADA EN VIGOR
00	Irene Consuegra	Marzo 2013	Dirección Científica M ^a Ángeles Muñoz Fernández	Marzo 2013	Marzo 2013
Modificaciones:					

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 2 -

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

El cáncer colorrectal ha ido aumentando su frecuencia en los países desarrollados en los últimos años, diagnosticándose en nuestro país 11.000 nuevos casos por año. Representa en conjunto el 15% de los tumores diagnosticados en el hombre, por lo que es esencial avanzar en la comprensión y la lucha contra esta enfermedad. El estudio farmacogenético es el estudio de las diferencias genéticas individuales y su relación con la forma en que un paciente y su enfermedad (cáncer colorrectal) responden al tratamiento farmacológico, tanto a nivel de eficacia como a nivel de toxicidad. Al igual que los genes heredados de sus padres influyen en el color de sus ojos, color de pelo y estructura corporal, las diferencias en este material genético heredado también pueden desempeñar un papel decisivo en la forma en la que su organismo y el tumor pueden responder al tratamiento quimioterápico.

Las muestras que usted proporcione permitirán un estudio de genes importantes implicados en el mecanismo por el que su cuerpo descompone, transporta y elimina los fármacos, así como otros rasgos genéticos que podrían predecir tanto la respuesta de su tumor como las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico. Esta información es esencial para comprender cómo los enfermos y sus tumores responden a un mismo tratamiento quimioterápico, que redundará en beneficiar a futuros pacientes que desarrollen un cáncer parecido, a desarrollar nuevos fármacos o a mejorar los tratamientos ya existentes, , haciéndolos más eficientes y seguros.

En relación a la cohorte de oncología (subestudio cáncer colorrectal con tratamiento quimioterápico) que se lleva a cabo en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid) y que el/la Dr/Dra..... le ha presentado, se le invita a participar colaborando con sus muestras de sangre y con la información clínica relevante asociada a las mismas.

Si usted da el consentimiento para participar en esta cohorte, se le extraerán de 3 a 5 ml de sangre para el almacenamiento de sus productos derivados (ADN) en el

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 3 -

BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Este biobanco, dirigido por la Dra. M. Ángeles Muñoz Fernández y coordinado por Isabel García Merino, está situado en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid) y se dedica a la recepción, el procesamiento y el almacenamiento de muestras biológicas de diversa índole, procedentes de distintos servicios del hospital. Posteriormente, las muestras almacenadas se entregarán, bajo acuerdos de cesión, a proyectos de investigación relacionados con oncología, previamente aprobados por un Comité de Ética de la Investigación y por el Comité Científico del BioBanco. De este modo, su material biológico permanecerá en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón hasta que se entregue para dichos proyectos.

De sus células podemos obtener información clínica relevante, así como ADN, cuyo análisis permite determinar las características físicas personales, de modo que a partir de él se puede obtener información acerca de su salud. Estos datos nos permitirán, entre otras cosas, determinar qué factores genéticos influyen en la respuesta personal de cada paciente al tratamiento quimioterápico en cáncer colorrectal.

La toma de muestras de sangre se llevará a cabo en el Hospital, de forma similar a otros análisis que le hayan sido realizados. Como probablemente conoce, la extracción puede provocar una molestia en el punto en que se introduce la aguja en la piel y, a veces, puede ocasionar un pequeño hematoma que suele desaparecer en pocos días. Ocasionalmente, puede producir mareo. Para esta cohorte, de cada participante se llevará a cabo una única extracción de sangre en cualquier momento del tratamiento quimioterápico, que coincidirá con una analítica de revisión.

Por otra parte, y en relación con la información clínica, si usted da el consentimiento para participar en esta cohorte, los datos clínicos derivados de su seguimiento habitual se almacenarán de forma indefinida en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica, Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El coordinador de esta cohorte es el Dr. Luis López Fernández. Estos datos serán almacenados y analizados conjuntamente con los del resto

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 4 -

de pacientes incluidos en esta cohorte, y posteriormente se podrán ceder a proyectos de investigación.

Las muestras biológicas almacenadas en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y sus datos asociados podrán utilizarse para cualquier investigación biomédica en los términos que prescribe la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y se custodiarán y cederán a terceros, con fines de investigación, según lo establecido en esta norma y en el resto de la legislación nacional vigente referida a esta materia. Estos datos y muestras servirán para estudiar los factores que pueden influir la eficiencia y toxicidad al tratamiento quimioterápico del cáncer colorrectal.

Se le pide su consentimiento para que con su sangre y con su información clínica se realice:

1. Un almacenamiento de muestras (ADN) y de datos clínicos por un tiempo indefinido.
2. Análisis y estudios en dichas muestras y datos, entre ellos los análisis de ADN, también llamados de carácter genético.

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderles en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile. Tampoco obtendrán ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en esta cohorte. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de sus muestras y datos, y los de muchas otras personas participantes en esta cohorte, supondrán una fuente valiosa de información que revertirá en un mejor conocimiento de esta enfermedad, con el consiguiente avance médico y la mejora del cuidado de los pacientes afectados por esta patología.

Los datos obtenidos de las muestras no le serán comunicados ni a usted ni a su médico, excepto en el caso de que los hallazgos tengan una implicación significativa en

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 5 -

su salud y exista una posibilidad real de mejora. En este caso tendrá derecho a conocer todo tipo de datos, incluidos los genéticos, que se obtengan a partir de sus muestras. Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos. A partir de los datos obtenidos de sus muestras se puede conseguir información sobre su salud y la de sus familiares, y usted tiene derecho a decidir sobre la comunicación de estos resultados y, si usted lo desea, ejercitar su potestad de no ser informado.

Su participación es voluntaria y usted es libre de solicitar la retirada de sus muestras del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón, siempre y cuando estas no hayan sido anonimizadas y por tanto imposibles de identificar. También puede ejercitar derechos de acceso, rectificación o cancelación de sus datos clínicos almacenados en el Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica, Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, en cualquier momento. Tanto la solicitud de retirada de muestras, como la de acceso, rectificación o cancelación a los datos asociados, puede llevarse a cabo por cualquier motivo, sin tener que dar ninguna explicación y sin que repercuta negativamente sobre su tratamiento futuro. Para solicitar la retirada de sus muestras y/o la destrucción o rectificación de los datos clínicos comunique esta decisión a su médico y solicítele que lo ponga en conocimiento del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y del coordinador de cohorte de oncología (subestudio cáncer colorrectal con tratamiento quimioterápico). También puede ponerse directamente en contacto con el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y con el Dr. Luis López Fernández en las direcciones de correo electrónico: BioBancoVIH.hgugm@gmail.com y llfernandez@salud.madrid.org, respectivamente. En este caso, se procedería a la destrucción de las muestras y/o a la rectificación o exclusión de la información clínica. Sin embargo, esta destrucción no se hará extensible a los datos de las investigaciones que ya se hayan realizado previamente con las muestras y los datos clínicos.

Los datos personales que se recojan sobre usted, incluidos aquellos que se soliciten adicionalmente al hospital, conforme a la necesidad de la investigación que nos ocupa y siempre bajo su autorización, serán confidenciales y se tratarán conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 6 -

Carácter Personal, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica y el resto de legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose únicamente de acuerdo con los objetivos descritos en el presente comunicado. Cualquier relación entre la muestra y la identidad personal del paciente tiene carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se le informa de que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle, manteniéndose en todo momento su confidencialidad.

En el momento en que usted consienta el uso de sus muestras para los fines de investigación aplicada descritos, éstas serán sometidas a un proceso de disociación. Es decir, usted sólo será identificado por un número y/o código, constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, si podrán acceder a otros datos como el sexo o la edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial debidamente inscrito en la Agencia de Protección de Datos de la Comunidad de Madrid, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, cuya titularidad corresponde al Hospital General Universitario Gregorio Marañón, con la finalidad de gestionar el proyecto de investigación descrito en el presente consentimiento.

Si usted lo desea, y previa petición expresa, el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón le informará sobre los estudios que se están llevando a cabo con sus muestras y datos clínicos.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 7 -

Si en un futuro cesan las actividades del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón, informaremos a su médico para que contacte con usted y ponga en su conocimiento esta circunstancia. En este caso, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición y a la del resto de los participantes en el Registro Nacional de Biobancos, para que puedan manifestar su conformidad con el destino previsto para las muestras.

Esta *Hoja de Información y Consentimiento Informado* se expedirá en tres ejemplares firmados: uno para usted, otro para su médico que lo guardará en su historia clínica y un tercero para entregar al BioBanco del Hospital Gregorio Marañón.

Se contempla la posibilidad de que personal acreditado por las Autoridades Sanitarias Españolas y/o representantes del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital puedan realizar una auditoría de la cohorte para comprobar que se está llevando a cabo de forma correcta desde el punto de vista ético y científico, siempre dentro de la más estricta confidencialidad.

No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda, tanto al inicio del estudio como en cualquier momento a lo largo del mismo.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 8 -

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

OBTENCIÓN DE SANGRE PARA SU PROCESAMIENTO Y
ALMACENAMIENTO EN EL BIOBANCO DEL HOSPITAL GREGORIO
MARAÑÓN, OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS Y ANALÍTICOS PARA SU
REGISTRO EN EL LABORATORIO DE FARMACOGENÉTICA Y
FARMACOGENÓMICA, SERVICIO DE FARMACIA DEL HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN Y CESIÓN DE MUESTRAS Y DATOS
CLÍNICOS CON FINES INVESTIGADORES.

YO,

Declaro que:

1. He leído la Hoja de Información que me ha sido entregada.
2. He podido hacer preguntas sobre la obtención de sangre, su almacenamiento en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón y el análisis de las muestras, así como sobre la cesión de datos clínicos al Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica, Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
3. He hablado y he aclarado las dudas con el Dr.....
4. Entiendo que mi participación es voluntaria.

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 9 -

5. Comprendo que puedo solicitar la destrucción de mis muestras y su información clínica en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos futuros.

Por favor, firme donde proceda:

- Doy mi consentimiento para que se me realice la extracción de sangre y el almacenamiento de sus componentes en el BioBanco del Hospital Gregorio Marañón.

Fecha:

Firma del donante:

- Doy mi consentimiento para la cesión de mis muestras y datos clínicos y lo estipulado en esta Hoja de Información.

Fecha:

Firma del donante:

Si usted desea incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras y datos clínicos, indíquelo a continuación.

Este documento es propiedad del BioBanco del Hospital Gregorio Marañón. Queda prohibida su copia sin autorización expresa.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA COHORTE DE ONCOLOGÍA
(SUBESTUDIO CÁNCER COLORRECTAL CON
TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO)

BB F3y/Rev00/Marzo 2013

- 10 -

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

- Quiero ejercer mi derecho a no ser informado de los resultados obtenidos con los estudios realizados con mis muestras, incluso cuando los hallazgos tengan una implicación significativa en mi salud y exista una posibilidad real de mejora (firmar sólo si procede).

Fecha:

Firma del donante:

Fecha:

Nombre del investigador que informa:

Firma del investigador:

ANEXO 2

Pharmacological Research 120 (2017) 133–137



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

Invited Perspective

Identification of new SNPs associated with severe toxicity to capecitabine



Marta Pellicer^a, Xandra García-González^a, María I. García^a, Luis Robles^b,
Cristina Grávalos^b, Pilar García-Alfonso^a, Vanessa Pachón^c, Federico Longo^c,
Virginia Martínez^d, Carolina Blanco^a, Irene Iglesias^e, María Sanjurjo^a,
Luis A. López-Fernández^{a,*}

^a Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain^b Hospital Universitario Doce de Octubre, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain^c Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain^d Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain^e Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2017

Received in revised form 10 March 2017

Accepted 23 March 2017

Available online 27 March 2017

Chemical compounds studied in this article:

Capecitabine (PubChem CID: 60953)

5-fluorouracil (PubChem CID: 3385)

Keywords:

Pharmacogenetics

Tag SNPs

Drug adverse reaction

Capecitabine

ABSTRACT

Predicting individual risk of chemotherapy-induced severe adverse reaction is a critical issue when selecting the best treatment for cancer patients. SNPs have been identified in genes involved in the pharmacodynamics of fluoropyrimidines, and guidelines even recommend genotyping some *DPYD* variants in order to estimate the risk of toxicity. However, the predictive value of this approach remains insufficient, thus limiting its clinical implementation. The aim of the present study was to identify new genetic variants by selecting a group of tag SNPs in genes associated with the pharmacodynamics of fluoropyrimidines (*CDA*, *DPYD*, *ENOSF1*, *CES1*, *TYMS*, *SLC22A7*, *TYMP*, and *UMPS*). For this purpose, 23 selected SNPs were genotyped on an OpenArray™ platform in a cohort of 301 colorectal cancer patients receiving capecitabine-based chemotherapy. Univariate and multivariate statistical analysis by logistic regression revealed 10 SNPs associated with severe adverse reactions to capecitabine ($P < 0.05$): rs1048977, rs12726436, and rs2072671 in *CDA*; rs12119882 in *DPYD*; rs2853741 in *TYMS*; rs699517 in *TYMS/ENOSF1*; rs2270860 and rs4149178 in *SLC22A7*; and rs2279199 and rs4678145 in *UMPS*. Except for rs2072671, no association had previously been reported between these SNPs and the risk of capecitabine-induced toxicity. The use of tag SNPs to find new polymorphisms related to adverse reactions to capecitabine was successful. These new variants could increase the predictive power of currently available tests and thus prevent severe adverse reactions to capecitabine.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Despite recent advances in the management of colorectal cancer (CRC), fluoropyrimidines constitute one of the best therapeutic

options [1]. Adverse drug reactions (ADRs) induced by fluoropyrimidines, which are included in most treatment options, remain very problematic. They can lead to rejection of treatment lines, thus reducing the chances of cure, and loss of efficacy of treatment through delays, reductions or disruptions. Depending on the regimen used, grade 3–4 toxicity is recorded in 10–30% of patients [2–5]. Toxicity can even be fatal, mainly in adjuvant settings [6].

Capecitabine, a pro-drug of 5-fluorouracil (5-FU), is at least equivalent to 5-FU in terms of progression-free survival and overall survival through improved flexibility and adherence [7,8]. However, its main adverse effects are diarrhea, nausea, vomiting and hand-foot syndrome (HFS) [9,10]. In addition, capecitabine is often part of a regimen that includes other cytotoxic drugs. While improving overall therapeutic effectiveness, such regimens often intensify current toxicity and are accompanied by additional

Abbreviations: CRC, Colorectal Cancer; ADRs, Adverse Drug Reactions; 5-FU, 5-fluorouracil; HFS, Hand-Foot Syndrome; *DPYD*, Dihydropyrimidine Dehydrogenase; SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms; *CDA*, Cytidine Deaminase; *UMPS*, Uridine Monophosphate synthetase; *SLC22A7*, Solute Carrier family 22 member 7; *CES1*, Carboxylesterase 1; *TYMS*, Thymidylate Synthetase 1; *ENOSF1*, Enolase Superfamily member 1; *TYMP*, Thymidine Phosphorilase; FDR, False Discovery Rate.

* Corresponding author at: Laboratory of Pharmacogenomics, Pharmacy Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain.

E-mail address: luis.lopez@iisgm.com (L.A. López-Fernández).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yphrs.2017.03.021>

1043-6618/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO 3

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Pharmacogenomics



Use of exome sequencing to determine the full profile of genetic variants in the fluoropyrimidine pathway in colorectal cancer patients affected by severe toxicity

Aim: To identify genetic variants associated with capecitabine toxicity in fluoropyrimidine pathway genes using exome sequencing. **Patients & methods:** Exomes from eight capecitabine-treated patients with severe adverse reactions (grade >2), among a population of 319, were sequenced (Ion Proton). SNPs in genes classified as potentially damaging (Sorting Intolerant from Tolerant and Polymorphism Phenotyping v2) were tested for association with toxicity in a validation cohort of 319 capecitabine-treated patients. **Results:** A total of 17 nonsynonymous genetic variants were identified. Of these, five putative damaging SNPs in *DPYD*, *ABCC4* and *MTHFR* were genotyped in the validation cohort. *DPYD* rs1801160 was associated with the risk of toxicity ($p = 0.029$) and *MTHFR* rs1801133 with delayed administration of chemotherapy due to toxicity ($p = 0.047$). **Conclusion:** Exome sequencing revealed two specific biomarkers of the risk of toxicity to capecitabine.

First draft submitted: 19 June 2017; Accepted for publication: 28 June 2017; Published online: 26 July 2017

Keywords: adverse drug reaction • capecitabine • next-generation sequencing

Fluoropyrimidine-based chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) or its prodrug capecitabine has been the cornerstone of treatment of colorectal cancer (CRC) for many years [1,2]. Combined regimes of fluoropyrimidine with oxaliplatin or irinotecan are common in the treatment of this disease [3]. Clinical trials have demonstrated that administration of fluoropyrimidine-based regimens results in a statistically significant prolongation of survival in patients with CRC [4].

The drawback of these regimens is the appearance of adverse drug reactions (ADR). Toxicity can lead to rejection of treatment lines with better potential for cure or cause dose reductions and/or delays, with a possible loss of efficacy [5]. In addition, adverse reactions affect patients' quality of life and have significant cost implications [6]. Approximately 31–34% of patients receiving 5-FU experience grade 3–4 toxicity, and it is estimated that toxicity is fatal in around 0.5% [7].

The toxicity profile of 5-FU, which is largely influenced by intravenous administration [2], differs slightly from that of capecitabine. Thus, capecitabine more frequently induces hand-foot syndrome (HFS), gastrointestinal toxicity, mucositis and stomatitis [8,9].

An individual patient's response to fluoropyrimidines in terms of both efficacy and toxicity is affected by genetic variants. The pharmacodynamic and pharmacokinetic pathways by which capecitabine is converted to 5-FU are well known. These pathways provide 33 candidate genes whose variability may play a role in toxicity [10]. However, despite the large number of publications on this topic, high-level evidence is available for only a few polymorphisms, mainly in *DPYD*.

DPYD plays a key role in the metabolism of 5-FU. Variants in this gene have been extensively studied to prevent severe ADRs to fluoropyrimidines, and dosing guidelines have been suggested for some

Marta Pellicer¹, Xandra García-González¹, María I García¹, Carolina Blanco¹, Pilar García-Alfonso¹, Luis Robles², Cristina Grávalos², Daniel Rueda², Joaquín Martínez², Vanessa Pachón³, Federico Longo³, Virginia Martínez⁴, Irene Iglesias⁵, Sara Salvador¹, María Sanjurjo¹ & Luis A López-Fernández^{*1}

¹Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Doce de Octubre, Hospital Universitario Doce de Octubre, Madrid, Spain

³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

⁴Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

⁵Pharmacology Department, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

*Author for correspondence:

Tel.: +34 914265026

luis.lopez@iisgm.com

Future
Medicine



part of



ANEXO 4

Producción científica: artículos publicados y comunicaciones a congresos

Artículos publicados

- Pellicer M, García-González X, García MI, Robles L, Grávalos C, García-Alfonso P, Pachón V, Longo F, Martínez V, Blanco C, Iglesias I, Sanjurjo M, López-Fernández LA. *Identification of new SNPs associated with severe toxicity to capecitabine*. Pharmacological Research (2017) 120: 133–137. Factor de impacto 4,480. (Cuartil 1, Pharmacology and Pharmacy 31/257).
- Pellicer M, García-González X, García MI, Blanco C, García-Alfonso P, Robles L, Grávalos C, Rueda D, Martínez J, Pachón V, Longo F, Martínez V, Iglesias I, Salvador S, Sanjurjo M, López-Fernández LA. *Use of exome sequencing to determine the full profile of genetic variants in the fluoropyrimidine pathway in colorectal cancer patients affected by severe toxicity*. Pharmacogenomics (2017) 18: 1215–1223. Factor de impacto 2,350. (Cuartil 3, Pharmacology and Pharmacy 132/257).
- García-González X, Cortejoso L, García MI, García-Alfonso P, Robles L, Grávalos C, González-Haba E, Pellicer M, Sanjurjo M, López-Fernández LA. *Variants in CDA and ABCB1 are predictors of capecitabine-related adverse reactions in colorectal cancer*. Oncotarget (2015) 6: 6422–30. Factor de impacto 5,168. (Cuartil 1, Oncology 36/213).

Comunicaciones a congresos

AUTORES: Pellicer M, García MI, García X, García-Alfonso P, Grávalos C, Robles L, Rueda D, Martínez J, López-Fernández LA.

TÍTULO: *Secuenciación de exomas en pacientes de cáncer colorrectal con reacciones adversas severas a la quimioterapia con capecitabina*.

CONGRESO: VII Congreso de la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica. Abril 2015. Madrid.

MODALIDAD: Comunicación oral.